

SUZAN CRISTINA ROSSI

**PRODUÇÃO DE AROMAS FRUTAIS POR *Ceratocystis fimbriata* CULTIVADO
EM POLPA CÍTRICA, FARELO DE SOJA E MELAÇO DE CANA POR
FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE
PECTINASE (POLIGALACTURONASE), ESTERASES E LIPASE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Processos Biotecnológicos, do Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos do Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriane B. P. Medeiros

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a Luciana P. S. Vandenberghe.

CURITIBA
2011

AGRADECIMENTOS

À professora doutora Adriane B.P. Medeiros pela orientação, apoio e paciência em todos os momentos do desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores deste departamento que auxiliaram na minha formação.

A todos os meus colegas do laboratório pela ajuda, discussões e descontração durante o desenvolvimento das atividades realizadas.

À minha família, meu marido André e meus filhos Pedro e Raul pela compreensão durante a minha ausência.

À minha mãe Maria, pela ajuda nas horas difíceis e ao meu pai, Antonio.

A todos os meus familiares pelo carinho e apoio.

A CAPES pelo suporte financeiro.

A UFPR e ao programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos pela estrutura necessária para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Fermentação no Estado Sólido (FES) e Substratos	3
2.1.1. Produção de aromas por FES	4
2.1.2 Substratos	5
2.1.2.1 Polpa Cítrica (PC)	6
2.1.2.2 Farelo de Soja (FS)	6
2.1.2.3 Melaço de Cana e Melaço de Soja	7
2.2 Produção de Aromas por Vias Biotecnológicas	8
2.2.1 Produção de Aromas por Células Vegetais	10
2.2.2 Produção de Aromas por Microorganismos	11
2.2.3 Síntese de Aromas por Conversão Enzimática	12
2.2.3.1 Pectinases	13
2.2.3.2 Esterases	14
3. OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo Geral	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Microorganismos e Preparo do Inóculo	23
4.1.2 Seleção de cepa	23
4.2 Preparo do substrato	24
4.3 FES	25
4.4 Otimização da Produção de Aromas	25
4.4.1 Primeiro Planejamento Experimental	26
4.4.2 Segundo Planejamento Experimental	26
4.4.3 Testes da Suplementação da FES com Fontes de Carbono e Nitrogênio	27
4.4.4 Terceiro Planejamento Experimental	27
4.4.5 Quarto Planejamento Experimental	29
4.5 Análises dos Voláteis	30
4.5.1 Determinação de “OAV” (<i>Odour Activity Value</i>)	32
4.6 Análises Físicas e Químicas do fermentado	32
4.6.1 Análises Enzimáticas do Fermentado	33
4.6.1.1 Atividade de Pectinases (Poligalacturonases)	33
4.6.1.2 Atividade de esterase	34
4.6.1.3 Atividade de lipase	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 Seleção de Cepa	36
5.2 Valores de “OAV”	36
5.3 Primeiro Planejamento Experimental:	38
5.4 Segundo Planejamento Experimental Fatorial Completo	40

5.5 Testes da Suplementação da FES com Fontes de Carbono e Nitrogênio...	42
5.6 Terceiro Planejamento Experimental	45
5.7 Quarto Planejamento Experimental	48
5.8 Produção de Aromas por FES e a Cinética da Produção de Voláteis Totais, das Condições Físico-Químicas e Biomassa	51
5.9 Atividades de Pectinase, Esterases, Lipase e Produção de Aromas	54
5.9.1 Obtenção do Extrato Bruto	54
5.9.2 Resultados de Atividade Enzimática Quando Analisadas Somente em Polpa Cítrica e em Condições Otimizadas.....	56
5.9.3 Produção de Voláteis Totais e Pectinase	57
5.9.4 Atividade de Esterase	60
5.9.5 Atividade de Lipase.....	62
6. CONCLUSÃO.....	67
7. TRABALHOS FUTUROS/PERSPECTIVAS	69
REFERÊNCIAS.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação entre FES e Fermentação Submersa.....	4
Tabela 2: Exemplos de trabalhos que produziram compostos de aroma com microorganismo	5
Tabela 3: Composição da Polpa Cítrica	6
Tabela 4: Composição do Farelo de Soja	7
Tabela 5: Exemplos de Métodos para Obtenção de Compostos de Aromas	9
Tabela 6: Produção de ésteres acetato pela ação da AATase e esterase durante a fermentação por leveduras.....	16
Tabela 7: Produção de esterases por diferentes microorganismos.....	17
Tabela 8: Primeiro Planejamento fatorial 2^{5-2} com duas repetições no ponto central para as variáveis pH, umidade, taxa de inóculo, temperatura e granulometria	26
Tabela 9: Segundo Planejamento fatorial 2^2 com duas repetições no ponto central	27
Tabela 10: Apresentação dos níveis decodificados e fatores para o terceiro Planejamento Experimental Completo (DCCR).....	28
Tabela 11: Matriz com os níveis codificados dos experimentos para o terceiro Planejamento Experimental Completo	29
Tabela 12: Apresentação dos níveis e fatores para o quarto Planejamento Experimental Completo	29
Tabela 13: Matriz de experimentos para o quarto planejamento experimental completo.....	30
Tabela 14: Tempo de Retenção dos Padrões e Valor do “Threshold”	31
Tabela 15: Compostos voláteis presentes no “headspace” do <i>C. fimbriata</i> CBS 374.83 em FES após 48 horas de cultura.	36
Tabela 16: Valores de “OAV” calculados a partir dos resultados obtidos para produção de compostos voláteis por <i>C. fimbriata</i> CBS 374.83 cultivado em polpa cítrica, farelo de soja e melão de cana.	37
Tabela 17: Anova da otimização das variáveis: pH, umidade inicial, temperatura, taxa de inóculo e granulometria.	40
Tabela 18: Resultado de Anova para o segundo Planejamento Experimental Completo (2^2)	42
Tabela 19: Resultados do terceiro Planejamento Experimental Completo incluindo concentração de voláteis totais, acetato de etila e acetato de isoamila como variáveis dependentes.....	46
Tabela 20: Resultados de Anova para o Planejamento Composto Central(DCCR)	47
Tabela 21: Resultados de Anova para o quarto Planejamento Composto Central (DCCR).....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Enzimas envolvidas na síntese de acetato de isoamila (álcool acetil transferase e esterase).....	13
Figura 2: Reação de hidrólise catalisada por triacilglicerol lipases.....	19
Figura 3: Fluxograma das etapas realizadas durante a FES para produção de aromas naturais pela cepa <i>C. fimbriata</i>	25
Figura 4: Voláteis totais produzidos pelas cepas <i>Ceratocystis fimbriata</i> CBS 146.53 e 374.83 em polpa cítrica por FES	38
Figura 5: Diagrama de efeitos de pareto para o primeiro planejamento 2^{5-2} para o primeiro estudo. Fatores: pH,umidade, temperatura, taxa de inóculo e granulometria.Variável dependente: concentração de voláteis totais.....	39
Figura 6: Diagrama de efeitos de Pareto para o segundo planejamento 2^2 . Variável dependente: concentração de voláteis totais.	41
Figura 7: Concentração de voláteis totais variando as concentrações de 15 e 20 % de melaço de cana (MC) e melaço de soja (MS).	43
Figura 8: Concentração de acetato de etila variando as concentrações de 15 e 20 % de melaço de cana (mc) e melaço de soja (ms).....	43
Figura 9: Concentração de acetato de isoamila variando as concentrações de 15 e 20% de melaço de cana (mc) e melaço de soja (ms).....	44
Figura 10: Evolução de Voláteis Totais durante FES com adição de diferentes concentrações de nitrogênio (N) no substrato (PC)	45
Figura 11: Diagrama de Pareto apresentando resultados do terceiro planejamento composto central com 17 ensaios, para avaliação dos fatores farelo de soja, melaço de cana e solução salina.	47
Figura 12: Diagrama de Pareto com resultados do quarto planejamento composto central.....	49
Figura 13: Superfície de resposta gerada com os resultados da última etapa da otimização da produção de voláteis totais durante FES com 11 ensaios.....	49
Figura 14: Superfície de resposta gerada com os resultados da última etapa da otimização da produção de voláteis totais durante FES.....	50
Figura 15: Evolução de Voláteis durante FES em condições otimizadas.....	51
Figura 16: Cinética da Produção de Aromas por FES pela cepa <i>C. fimbriata</i> CBS 374.83, com resultados das análises de consumo de açúcares totais e redutores, concentração de proteínas, evolução do pH e umidade.	52
Figura 17: Evolução da Biomassa por método de dosagem do ergosterol por HPLC durante a produção de aromas por FES pela cepa <i>C. fimbriata</i> CBS: 374.83	53
Figura 18: Atividade da pectinase com extração em água, em tampão e a produção de voláteis totais.....	55
Figura 19: Comparação da atividade da pectinase durante FES com polpa cítrica como substrato e com polpa cítrica mais adição de nutrientes (condição otimizada)	56
Figura 20: Atividade da pectinase e produção de voláteis totais durante FES na condição otimizada.....	58

Figura 21: Consumo de açúcares durante FES para análise de pectinase	59
Figura 22: Resultados de atividade de esterases em fermentado congelado durante FES	60
Figura 23: Resultados de atividade de esterases em fermentado congelado e seco em estufa durante FES.....	61
Figura 24: Condições Físico-Químicas durante FES para análise de esterases..	61
Figura 25: Atividade da lipase e produção de voláteis totais em FES pela cepa <i>C. fimbriata</i> CBS 374.83.	64
Figura 26: Consumo de açúcares totais e redutores durante a FES, e concentração de proteínas.	65
Figura 27: Condições Físico-Químicas durante FES para análises de lipases	66

RESUMO

Os aromas produzidos por microorganismos geralmente são reconhecidos como naturais e têm um grande potencial econômico para obtenção de uma ampla variedade de biomoléculas de interesse em alimentos. A produção industrial de aromas corresponde a 25% do mercado mundial de aditivos alimentares. Vários são os componentes que contribuem para o aroma final, sendo que, o acetato de etila e acetato de isoamila são dois dos principais responsáveis pelo impacto do aroma de banana. O fungo *Ceratocystis fimbriata* tem potencial para síntese de ésteres, cresce rapidamente e produz uma variedade de compostos de aromas, dependendo das condições de cultura e dos substratos utilizados. O objetivo deste trabalho foi produzir compostos de aroma utilizando subprodutos da agroindústria como substrato da fermentação no estado sólido (FES). Oito componentes foram identificados no "headspace" do cultivo: acetaldeído, acetato de etila, acetato de propila, acetato de isoamila, isobutirato de etila, 2-hexanona, 2-hexanol e etanol. Realizou-se a otimização do processo com o intuito de determinar as melhores condições para aumentar a produção de compostos de aroma por *C. fimbriata* em fermentação no estado sólido (FES). As melhores condições encontradas foram taxa de inóculo de 10^7 esporos/g de substrato (gs), umidade de 75%, pH inicial de 6,0, temperatura de 30 °C e como substrato uma mistura de polpa cítrica, farelo de soja e melaço de cana. Os experimentos foram acompanhados durante 144 horas de FES e o "headspace" analisado a cada 24 horas de fermentação, por cromatografia gasosa (CG). A produção máxima de voláteis totais obtida foi de 99,75 $\mu\text{mol eq. etanol/L.g}$ de substrato. Após a otimização do processo, analisou-se a presença das enzimas envolvidas no processo. Algumas enzimas catalisam a produção de compostos de aroma através de precursores moleculares ou estão envolvidas em alguma reação importante no processo de produção de aromas. Nesta pesquisa foram determinadas as atividades das enzimas pectinase (poligalacturonase), esterases e lipase. A atividade máxima de poligalacturonase foi de 59,59 U/gs. Para as esterases que hidrolisam álcool etílico, obteve-se 92,9 U/gs e 7,33 U/gs para as que hidrolisam o álcool isoamílico. A atividade lipolítica máxima observada foi de 40,98 U/gs. Estes resultados sugerem que as enzimas presentes no meio podem estar envolvidas direta ou indiretamente no processo de produção de aromas.

PALAVRAS-CHAVE: Aromas naturais, acetato de isoamila, FES, polpa cítrica, *C. fimbriata*, lipase, esterase e pectinase

ABSTRACT

The flavours produced by microorganisms are generally recognized as natural and have a great economic potential for obtaining a wide variety of biomolecules of interest in food. Aromas production corresponds 25 % of the food additives world market. Aroma is a compound chemical mixture (alcohols, aldehydes, ketones, acids, esters, lactones). Several components make up the final aroma, ethyl acetate and isoamyl acetate are the two main responsible for the impact of the banana aroma. The fungus *Ceratocystis fimbriata* has potential for ester synthesis, grows quickly and produces a variety of aroma compounds, depending on culture conditions. The products with applications in pharmaceutical and food can be produced from agro-industrial residues. The citric pulp (CP) is a byproduct of citric juice industries which export around one million tons per year. This study aimed to identify the aroma compounds produced in citric pulp which eight components were identified (acetaldehyde, ethyl acetate, propyl acetate, isoamyl acetate, ethyl isobutyrate, 2-hexanol, 2-hexanone and ethanol). The optimization process was conducted in order to determine the best conditions to increase production of aroma compounds with *C. fimbriata* by SSF. The best initial fermentation conditions were: inoculum size 1×10^7 spores/g dry matter; water content, 75% (w: w); pH 6.0 and temperature 30 °C. A mixture of citric pulp, soya bran and sugarcane molasses was used as substrate/support. The experiments were evaluated during 144 hours of FES and the headspace analyzed every 24 hours of fermentation by gas chromatography (GC). The maximum yield of total volatile production was 99.75 $\mu\text{mol eq. ethanol /L.g}$ dry base substrate. After the optimization process, the presence of enzymes involved in the process was analyzed. Some enzymes catalyze the production of aroma compounds through molecular precursors or are involved in some reaction in the process of production of flavorings. In this study were characterized the enzymes pectinase, esterases and lipase. The maximum activity of polygalacturase was 59.50 U/g of dry substrate, 92.9 U/g esterases which hydrolyzes ethyl alcohol and 7.33 U/g to isoamyl alcohol and 40.98 U/g. These results confirm that characterized enzymes can be involved directly or indirectly in aroma production.

KEY-WORDS: Natural flavours, isoamyl acetate, SSF, citric pulp, *C. fimbriata*, lipase, pectinase e esterase.

1. INTRODUÇÃO

Anualmente no Brasil a agroindústria gera aproximadamente 250 milhões de toneladas de resíduos. A utilização adequada destes resíduos ajuda a minimizar problemas ambientais e energéticos, podendo, além disso, gerar produtos com relevantes aplicações na indústria farmacêutica e de alimentos (AYUB, 2002). Nos últimos anos houve um aumento na tentativa de tornar mais eficiente a utilização de resíduos da agroindústria, (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003). O bagaço de cana, por exemplo, é utilizado atualmente como a principal fonte de energia necessária para usinas de açúcar e destilarias de etanol. O excedente de bagaço de cana pode ser usado em mais de 40 aplicações diferentes, como produção de etanol, papel e celulose, ração animal, etc. (ROCHA *et al.*, 2011) ou como suporte alternativo em micropropagação vegetal (MOHAN *et al.*, 2004).

A polpa cítrica, resíduo da agroindústria brasileira cuja exportação gira em torno de um milhão de toneladas por ano é utilizada como complemento para a ração animal, principalmente na pecuária (ABECITRUS, 2009). É obtida por meio do tratamento de resíduos sólidos e líquidos remanescentes da extração do suco de frutas cítricas. Entre eles: cascas, sementes e polpas principalmente de laranjas e limões (ABECITRUS, 2009).

Neste trabalho, a polpa cítrica é utilizada como substrato e suporte para o crescimento do fungo, e conseqüentemente, para a produção de aromas frutais por biossíntese.

A utilização de enzimas tem aumentado consideravelmente, especialmente nas indústrias de alimentos, bebidas alcoólicas e não alcoólicas, têxtil, farmacêutica, química e de papel e celulose. Atualmente as enzimas são produzidas naturalmente por organismos vegetais, animais, fungos filamentosos, leveduras e bactérias. Estes microrganismos podem ser inoculados em meios contendo resíduos provenientes do processamento de produtos agrícolas, utilizados como fonte de carbono e de outros nutrientes para a produção de compostos de maior valor agregado, como etanol, proteínas, enzimas,

aminoácidos e compostos de aroma. Como exemplo de bioprocessos desenvolvidos, indústrias de reciclagem utilizam enzimas produzidas por microorganismos para remoção de tintas da polpa de papel, facilitando o processo de produção e diminuindo custos e os resíduos gerados (MARQUES *et al.*, 2003).

O aroma é o resultado de misturas de compostos químicos de vários grupos funcionais, como alcoóis, aldeídos, cetonas, ácidos, lactonas e ésteres. Pode determinar a qualidade de um alimento, levando o consumidor à aceitação ou a rejeição de um produto. Sua produção por processos biotecnológicos tem grande importância devido ao aumento da preferência do consumidor por aditivos alimentares naturais ou por compostos de origem biológica. Vários microrganismos isolados de café e de materiais relacionados com café, como casca de café, folhas de pé de café, terra de cafezal, água de lavagem de café, foram selecionados quanto à produção de aromas. O fungo *Ceratocystis fimbriata* foi reportado como produtor de aroma intenso de frutas em casca de café por fermentação no estado sólido (MEDEIROS *et al.*, 2003). Este gênero produz uma grande variedade de aromas de frutas ou de flores (pêssego, abacaxi, banana, cítrico e rosa), dependendo da cepa e das condições de cultivo. *Ceratocystis fimbriata* tem potencial para síntese de éster, cresce rapidamente e produz uma grande variedade de aromas (PASTORE e UENOJO, 2006).

Este trabalho teve como objetivo a produção de aromas por *Ceratocystis fimbriata* e a identificação das principais enzimas envolvidas no processo. O processo de FES utilizando polpa cítrica e farelo de soja como substrato foi otimizado. A atividade enzimática de lipase, esterase e pectinase foram investigadas como possíveis participantes da síntese de ésteres como o acetato de etila e acetato de isoamila.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fermentação no Estado Sólido (FES) e Substratos

O processo de fermentação no estado sólido consiste no crescimento do microrganismo em substrato úmido, ausente de água livre. Como vantagens associadas a esse processo, pode-se observar a recuperação do produto mais concentrado, menor geração de resíduos, menor consumo de água e a possibilidade da utilização de subprodutos agroindustriais como substrato.

O desenvolvimento de novos processos com custos mais baixos, como a FES, pode ajudar a ultrapassar algumas das limitações atuais da produção de aromas por microorganismos, bem como tornar acessível e aumentar a variedade de compostos produzidos biotecnologicamente (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003).

Apesar da fermentação submersa (FSM) ainda ser o principal método biotecnológico utilizado industrialmente para a obtenção de produtos, a fermentação no estado sólido (FES) tem sido desenvolvida para obtenção de vários produtos com objetivo de diminuir custos de produção e a geração de resíduos tóxicos ao meio ambiente. Este processo, por exemplo, tem se mostrado vantajoso para o cultivo de fungos filamentosos na obtenção de enzimas e outros produtos, já que as condições da FES se assemelham às condições de vida natural destes microorganismos (COUTO e SANROMÁN, 2005).

A comparação entre a fermentação no estado sólido e a fermentação submersa está listada na Tabela 1.

Tabela 1: Comparação entre FES e Fermentação Submersa

Fermentação no Estado Sólido (FES)	Fermentação Submersa (FSM)
Meio de cultura não flui livremente	Meio de cultura sempre flui livremente
Consumo limitado de água, Sem liberação de efluentes líquidos	Grandes quantidades de consumo de água e descarte de efluentes líquidos
Fácil aeração	Aeração requer elevado fluxo
	Boa homogeneização
Baixo consumo de energia	Elevado consumo de energia

Fonte: Rimbault, 1997.

2.1.1. Produção de aromas por FES

Alguns autores têm desenvolvido pesquisas para viabilizar a produção de aromas por vias biotecnológicas, especialmente por FES, levando em conta a variedade e elevada geração de matéria orgânica, resíduos e sub-produtos da agroindústria. A Tabela 2 apresenta algumas dessas pesquisas:

Tabela 2: Exemplos de trabalhos que produziram compostos de aroma por FES

Autores/ano	Microorganismo	Substrato	Tempo de FES (h)	Concentração de Voláteis Totais
Medeiros <i>et al.</i> , (2006)	<i>C.fimbriata</i>	Casca de café	48 h	21,04 µmol/L.gs
			220 h em colunas*	30,95 µmol/L.gs
Medeiros <i>et al.</i> , (2000)	<i>K.marxianus</i>	Bagaço de mandioca	30 h	30,00 µmol/L.gs
Bramorski <i>et al.</i> , (1998)	<i>C.fimbriata</i>	Bagaço de mandioca		8,29 µmol/L.gs
Christen <i>et al.</i> , (1997)	<i>C.fimbriata</i>	Bagaço de mandioca	60 h	48,4 µmol/L
Soares <i>et al.</i> , (2000)	<i>C.fimbriata</i>	Casca de café + leucina	280h	32 µmol/L.gs
Christen <i>et al.</i> , (2000)	<i>R. oryzae</i>	Bagaço de mandioca + soja + bagaço de maçã + óleo de soja	36 h	Máximo de 4,79 µmol/L.gs
		Amaranto + solução salina		18,66 µmol/L.gs

Obs.: Nos tempos de FES indicados referem-se à FES em frascos de Erlenmeyers, exceto para * em colunas, os resultados apresentados são em µmol/ L de "headspace". grama de substrato (gs)

2.1.2 Substratos

A seleção de um suporte/substrato adequado para realização da FES é essencial. Pastrana *et al.* (1995) e Murado *et al.* (1997) estudaram a produção de ácido giberélico e amilases em FES com espigas de milho e partículas de poliuretano umedecido como substrato/suporte. A polpa cítrica foi utilizada como substrato no trabalho de Rodrigues *et al.* (2009) para a produção de ácido giberélico. Assim, conforme esses autores entre outros, os fatores mais importantes na escolha do suporte/substrato foram: tamanho de partículas, porosidade e composição química.

No Brasil, atividades agrícolas e agroindustriais produzem milhares de toneladas de subprodutos como bagaço de cana, bagaço de citros, cascas de

frutas, farelo de milho, etc. Nutricionalmente, a agroindústria produz dois tipos de resíduos fibrosos: os de alta digestibilidade, por exemplo, a polpa cítrica, o farelo de milho e resíduos de cerveja (cevada) e aqueles de baixa digestibilidade como bagaço de cana, cereais de milho, de soja, palha de amendoim, casca de algodão, casca de soja e restos de colheita (sementes de gramíneas forrageiras).

O bagaço de cana é o material fibroso resultante da extração do caldo por prensagem da cana, sendo geralmente queimado em caldeiras para gerar energia elétrica ou vapor de aquecimento. Outro resíduo importante no Brasil, em termos de volume e composição é o bagaço de polpa cítrica. Processa-se cerca de 80 milhões de toneladas de laranjas e limões por ano, gerando até 40 toneladas de resíduos sólidos, que são peletizados após neutralização e desidratação com óxido de cálcio (GRAMINHA *et al.*, 2008).

2.1.2.1 Polpa Cítrica (PC)

O farelo de polpa cítrica é principal sub-produto da indústria de sucos cítricos. Este material equivale a 50% do peso de cada fruta e tem umidade de aproximadamente 82%. Após passar pelo processo de industrialização o qual a polpa é triturada e seca até umidade de 12% (Tabela 3), em seguida o produto é peletizado (RODRIGUES, 2010).

Tabela 3: Composição da Polpa Cítrica

PROPRIEDADES	VALOR
Umidade (máximo)	12,0%
Proteína Bruta (mínimo)	6-8%
Extrato Etéreo (mínimo)	3-4%
Fibra Bruta (máximo)	14,0%
Matéria Mineral (máximo)	7-8%
Matéria Seca	88-89%

Fonte: União Farelos, 2010

2.1.2.2 Farelo de Soja (FS)

O farelo de soja é obtido a partir da industrialização dos grãos de soja, para extração de óleo por solvente, destinado principalmente para consumo humano. É um dos ingredientes mais importantes utilizado em ração animal, sendo rico em proteínas, com teores de fibras, sais minerais (IMCOPA, 2011) e vitaminas do complexo B (tiamina, colina e niacina) (União Farelos, 2010) (Tabela 4).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, na safra 2010/2011 colheu 68,7 milhões de toneladas de grãos e exportou 29,4 milhões de toneladas, (USDA, 2011).

Tabela 4: Composição do Farelo de Soja

PROPRIEDADES	VALOR
Umidade	12,5%
Proteína	48,0%
Gordura	2,0%
Fibras	3,5%
Cinzas	7,0%
Urease	0,25%

Fonte: IMCOPA, 2011

2.1.2.3 Melaço de Cana e Melaço de Soja

O melaço de cana é um subproduto da fabricação de açúcar de cana que possui oligoelementos, vitaminas e precursores, entre outros, que tornam este sub-produto de baixo custo interessante como aditivo, além dos altos teores de açúcares fermentescíveis. A produção de cana de açúcar no Brasil em 2008/2009 foi equivalente a 569 milhões de toneladas, sendo que a produção de açúcar para a mesma safra (2008/2009) foi de 31 milhões de toneladas e de etanol foi de 27 milhões de litros (UNICA, 2011). Segundo Paturau (2011), em uma produção de 200 milhões de toneladas de cana fresca, gera em torno de 16 milhões de melaço de cana, o que corresponderia a 8 % da produção.

Bringhenti, Cabello e Urbano (2007) demonstraram que a adição de melaço de cana ao resíduo amiláceo em doses a partir de 10% levou a um aumento no

teor de açúcares no mosto promovendo um aumento de 112% na produção de etanol, em relação ao substrato sem aditivo.

O melaço de soja é um subproduto da indústria de processamento de soja, a 80° Brix possui alta concentração de açúcares (31,87%), nitrogênio (9,44%) e minerais (6,36%) (PEREIRA, 2007). Pereira (2007) utilizou o melaço de soja como substrato para fermentação submersa por *Kluyveromyces marxianus* para obtenção de acetato de isoamila.

2.2 Produção de Aromas por Vias Biotecnológicas

A obtenção de aromas por vias biotecnológicas pode ser realizada de várias formas: produção por células vegetais, células microbianas ou conversão enzimática. A Tabela 5 demonstra vários compostos de aroma produzidos quimicamente ou por extração vegetal e que podem ser obtidos por vias biotecnológicas.

Vários compostos voláteis são importantes na formação dos aromas: acetaldeído, acetato de etila, de isoamila, de propila, de isopropila, de isobutila, etanol, butirato de etila, etc. A maioria são alcoóis, aldeídos, ésteres e cetonas. Estes podem ser identificados a partir da utilização de diversas técnicas instrumentais de química orgânica, tais como cromatografia gasosa e espectrometria de massa (JANSSENS *et al.*, 1992).

O acetato de isoamila é um dos compostos mais importantes na formação do aroma característico de banana madura. Além de ser utilizado como aroma, é também utilizado nas formulações de tintas como um excelente solvente ativo. Atua também como auxiliar na eliminação do “*blush*” ou branqueamento em formulações de lacas e tineres, combinado com solventes de evaporação mais lenta, como acetato de butilglicol e etilglicol. É um líquido límpido, pouco solúvel em água e miscível com a maioria dos solventes orgânicos. Possui média taxa de evaporação, compatível com a maioria das resinas sintéticas utilizadas em tintas e vernizes. Além disso, possui alta resistividade elétrica, atuando como regulador de condutividade. O acetato de isoamila contribui assim, para melhorar o rendimento

e as características de deposição de tintas base solvente aplicada eletrostaticamente (OXITENO, 2008).

Tabela 5: Exemplos de Métodos para Obtenção de Compostos de Aromas

Composto	Aroma (impacto)	Método de Produção	Microorganismo	Enzima	Referências
2-feniletanol	Frutas/rosas	Biossíntese	<i>S. cerevisiae</i> <i>K. marxianus</i> <i>A. niger</i>		Janssen (1991) Atika (1990)
Cetona de framboesa	Framboesa	Conversão enzimática Biossíntese	<i>A. niger</i> <i>C. boidinii</i>	B-glicosidase	Huguency (1995)
Ésteres e terpenos	Frutas/Flores	Biossíntese	<i>Ceratocystis sp</i>		Pandey (2000)
6- pentil- α -pirona	Coco	Biossíntese	<i>T.harzianum</i>		Hausler e Munch (1997)
Citronelol, geraniol e linalol	Frutal/floral-terpenos	Biossíntese	<i>K. lactis</i>		Pastore et al, (2003)
Γ -decalactona	Pêssego	Biossíntese	<i>S. odoratus</i>		Takahara (1972)
Vanilina	Baunilha	Bioconversão	<i>E.coli</i> (<i>Amycolatopsis sp</i>) <i>Artrobacter</i> , <i>Corynebacterium</i> ou <i>Pseudomonas strains</i>		Yoon (2005) Van Den Brent (1999)
2-heptanonas Metil cetonas Ácidos graxos Ácido octanóico	Queijo azul	Conversão enzimática de precursores, FES	<i>Penicillium roquefortii</i>	Lipase comercial	Tomasini et al (1995)
Metil -7, ácido isojaconico	Floral/jasmin	Conversão enzimática	<i>Bortrydiploidia theobromae</i>	Lipase comercial	Hausler e Munch (1997)
γ -octalactona, γ -undecalactona, γ -dodecalactona γ -lactona L-linalol	Pêssego Cítrico	Fermentação submersa	<i>Antrodia camphorata</i>		Lu (2011)
1-octen-3-ol, 2-octen-1-ol, 3-octanol, 1-octanol, 3-octanona	Cogumelos	Fermentação submersa	<i>Antrodia camphorata</i>		Lu (2011)

Adaptado de Medeiros *et al.*(2010), e Pandey *et al.* (2008)

Autores como Noguero-Pato *et al.*, (2009) e Losada *et al.*, (2011), relatam a importância de determinar cada componente do aroma em um aroma global calculando valores de “OAV” (*Odour Activity Value*), que é a proporção da concentração de um componente individual pelo valor de “*threshold*” (concentração mínima que pode ser detectada pelo nariz humano). Conforme SALGADO *et al* (2009), OAV é um termo usado para medir a importância de cada componente em um aroma global. Quando o valor de “OAV” é maior do que 1(um), este componente contribui diretamente para o aroma, entretanto, os componentes com “OAV” menor que 1, podem contribuir indiretamente por causa dos efeitos sinérgicos com outros componentes de aroma.

Nos EUA, o termo aroma natural significa essência ou extrato, proteína hidrolisada, destilado de qualquer produto de aquecimento ou conversão enzimática, que contenham componentes de aroma derivados de um tempero, suco de frutos, frutas, fungos comestíveis, ervas, brotos, cascas, material vegetal de raiz, folhas, ou similares, carnes, frutos do mar, ovos laticínios, ou produtos de fermentação dos mesmos. A principal função nos alimentos é aromatizar em vez de nutrir. Na Europa a definição de aromas naturais são substâncias ou preparações obtidas por processos físicos, microbiológicos ou enzimáticos oriundos de material de origem vegetal ou animal. No Brasil os aromas naturais são obtidos exclusivamente mediante métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos, a partir de matérias-primas naturais. (PANDEY *et al.*, 2008; ANVISA, 1999).

2.2.1 Produção de Aromas por Células Vegetais

Aromas de plantas são considerados metabólitos finais com informações bioquímicas importantes, variando com determinadas fases do metabolismo, independente do clima, localização geográfica ou situação política, além disso, a recuperação dos compostos é relativamente fácil.

A técnica de obtenção de aromas a partir de células vegetais pode variar desde extração por prensagem do fruto até a extração a seco por fluido supercrítico. Malaman *et al.* (2011) extraíram vários compostos de aroma com

características frutais de pitanga com utilização de dióxido de carbono ou induzindo a produção de aromas pela própria cultura de células vegetais. Culturas de células vegetais possuem habilidade de transformar substratos exógenos, como subprodutos industriais, em produtos de interesse. Várias plantas com características aromáticas são boas candidatas para a cultura de células vegetais, como a baunilha que é um dos ingredientes de aromas mais utilizados em alimentos, sendo um dos principais componentes produzidos durante a cultura de células da planta *Vanilla planifolia* (MEDEIROS *et al.*, 2010). Longo e Sanromán (2006) citam a produção de aromas por cultivo de células vegetais: aroma de maçã a partir do cultivo de *Malus silvestris*, de cacau a partir de *Theobroma cacao*, e de cebola a partir do cultivo de *Allium cepa* para a utilização na indústria de alimentos.

2.2.2 Produção de Aromas por Microorganismos

Muitos microorganismos são capazes de sintetizar compostos de aroma quando cultivados em meios de cultura adequados, demonstrando sua habilidade de conversão, que pode necessitar de diversas etapas bioquímicas (KEMPLER, 1983). Neto *et al.* (2004) conseguiram com o microorganismo *Geotrichum fragans* e *Geotrichum sp* uma produção significativa de compostos de aromas com características de frutas e derivados de chocolate. Chiappini (2011) reportou a produção de ésteres por *Pseudomonas fragi*; sendo que, o aroma de coco foi detectado em cultivos de *Trichoderma viride*, *Myocacia uda*, *Ischnoderma benzoinum*, *Trichoderma harzianum* e de espécies do gênero *Neurospora*. O agradável aroma de maçã foi percebido no cultivo da levedura *Dipodascus aggregatus*. Vinte compostos voláteis, predominantemente ésteres e terpenos foram identificados no meio de cultura de *Trichothecium roseum*; os monoterpenos citronelol, linalol e geraniol foram produzidos no cultivo de *Kluyveromyces lactis*. E o aroma de abacaxi intenso e agradável produzido pela levedura *Dipodascus magnusii*; os monoterpenos com qualidade sensorial de leve aroma frutal

produzido por duas linhagens de *Ambrosiozyma monospora*, e as notas frutais e florais produzidas por *Hansenula anomala*.

O fungo *Ceratocystis fimbriata*, fungo filamentoso, isolado de tronco de café segundo alguns autores apresentados na tabela 2, tem grande potencial para produção de ésteres, compostos de aroma com características de banana, abacaxi, pêssego, cítricos e rosas.

2.2.3 Síntese de Aromas por Conversão Enzimática

Apesar dos elevados custos da aplicação de enzimas microbianas na produção de aromas, estas podem oferecer alta seletividade para a conversão de um determinado substrato. Algumas enzimas (lipases, proteases, glicosidases, pectinases, esterases, etc.) catalisam a produção de compostos de aroma através de precursores moleculares. Também técnicas como a imobilização de enzimas ou regeneração da coenzima podem ser altamente eficientes e específicas em processos de biocatálise para a síntese de aromas (PANDEY *et al.*, 2008).

Muitas enzimas estão envolvidas na produção de aromas. As lipases estão envolvidas nas reações de esterificação e trans esterificações. As esterases estão envolvidas na produção de ésteres, as álcool acetil transferases estão envolvidas na formação de álcool (Figura 1). As pectinases, principalmente as pectinas liases e poligalacturonases, normalmente são produzidas durante o crescimento de algumas linhagens de fungos que produzem aromas de frutas (PASTORE e UENOJO, 2006). Dentre estas enzimas, as que possuem maior valor agregado para indústrias são as lipases que são largamente empregadas no processamento de óleos e gorduras, detergentes e desengraxantes, processamento de alimentos, síntese de produtos para química fina e fármacos, manufatura de papel e produção de cosméticos.

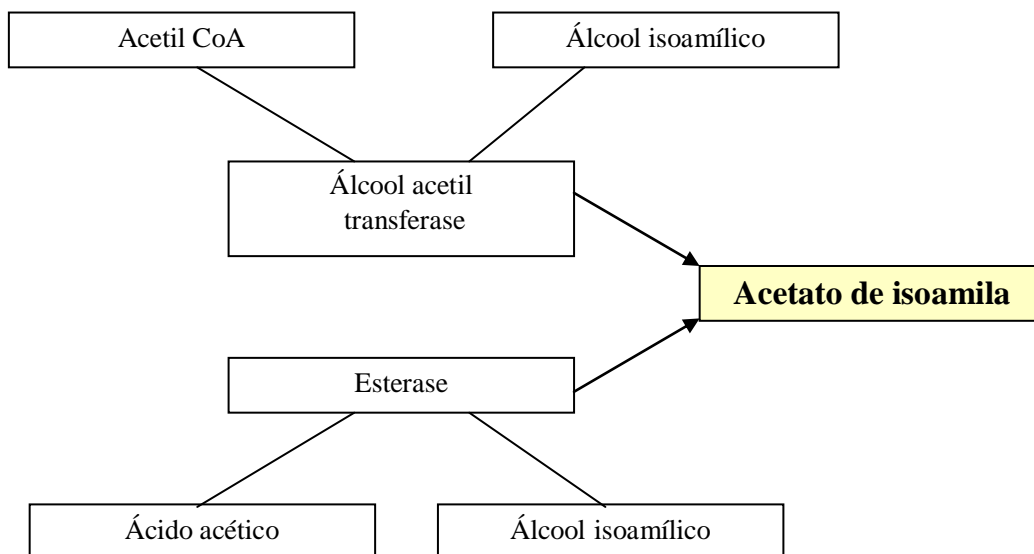


Figura 1: Enzimas envolvidas na síntese de acetato de isoamila (álcool acetil transferase e esterase).

FONTE: QUILTER *et al.* (2003).

2.2.3.1 Pectinases

As pectinases de origem microbiana apresentam grande importância comercial, correspondendo a 25% do mercado global de enzimas na indústria de alimentos (JAYANI *et al.*, 2005). Estas formam um grupo heterogêneo de enzimas que degradam substâncias pécicas.

As pectinas são polissacarídeos, compostos de alto peso molecular (variando entre 25 e 360 kDa), negativamente carregados, componentes da lamela média das células vegetais.

As pectinases podem ser produzidas por plantas, fungos filamentosos, bactérias e leveduras, sendo que a maioria das preparações enzimáticas comerciais é proveniente de fungos (JAYANI *et al.*, 2005).

Algumas das aplicações destas enzimas nas indústrias de alimentos são: amadurecimento de frutas, aumento no rendimento de extração de sucos e polpa de frutas como tomate, clarificação e redução de viscosidade em sucos de frutas, fermentação de chá e chocolate, tratamento de resíduos vegetais, degomagem de fibras nas indústrias têxteis e de papel, nutrição animal, enriquecimento protéico de alimentos infantis e extração de óleos. No que se refere à produção de aromas,

as pectinases também são utilizadas para reduzir o amargor excessivo em cascas de citrus, e restaurar o aroma perdido durante a secagem de pêssego e pickles processados. A infusão de pectinase e γ -glicosidase aumentam o aroma e as substâncias voláteis de frutas e vegetais, além de outras aplicações. Entre as pectinases estão a poligalacturonase e a pectina-liase (UENOJO e PASTORE 2007).

As pectinases podem ser divididas em três grupos: protopectinases (degradam a protopectina insolúvel), esterases (realizam a desesterificação da pectina e remoção dos metoxiésteres) e depolimerases (realizam a hidrólise das ligações glicosídicas entre os ácidos D-galacturônico que compõe a pectina). Nesse último grupo se encontram as poligalacturonases, que são as enzimas mais estudadas entre as pectinases (JAYANI *et al*, 2005).

A síntese das pectinases por microrganismos sofre influência dos componentes do meio de cultura, particularmente da fonte de carbono, presença de indutores (pectina e derivados) e das condições de cultivo, como pH, temperatura, aeração, agitação e tempo de incubação. Com relação às técnicas de fermentação, a fermentação no estado sólido geralmente é preferida por permitir a produção de enzimas brutas mais concentradas e, conseqüentemente, com menores custos de extração e purificação. Substratos típicos são resíduos agroindustriais, como cascas de frutas cítricas, bagaço de beterraba doce e extratos de farelo de trigo, por serem fontes de energia alternativa para crescimento e metabolismo e por estarem abundantemente disponíveis (UENOJO e PASTORE 2007). A filtração em gel possui capacidade mais baixa de carga e pode ser usada em estágios iniciais ou finais, neste último caso refinando o protocolo de purificação (SAID e PIETRO, 2005).

2.2.3.2 Esterases

As esterases são enzimas do grupo das hidrolases (carboxil éster hidrolases) capazes de catalisar a formação ou quebra de ésteres obrigatoriamente para substratos solúveis em água. Lipases e algumas pectinases pertencem ao grupo das esterases. Similar à lipase, o complexo enzima substrato é formado pela via

resíduo de serina com o seu sítio ativo. As esterases (E.C. 3.1.1.1), que muitas vezes são difíceis de diferenciar das lipases, são carboxil éster hidrolases amplamente distribuídas na natureza, pois atuam essencialmente catalisando a hidrólise de ésteres. Porém, sua atividade enzimática é restrita à hidrólise de ligações éster em substratos solúveis em água (ALVAREZ-MACARIE e BARATI, 2000). Por causa da sua utilidade, especialmente das esterases microbianas, são de grande interesse para aplicação em processos industriais (FAHMY *et al.*, 2008). Esterases e lipases microbianas podem melhorar a qualidade ou acelerar a maturação de queijos (OTERHOLM *et al.*, 1972), curar o bacon (HINRICHSSEN *et al.*, 1994) e fermentar salsichas (MCKAY, 1993). Esterases também podem resolver problemas de misturas racêmicas e servir para controle do teor de água em processos industriais (OZAKI *et al.*, 1995). Plata *et al.* (1998) determinaram a atividade específica de álcool acetil transferase e esterase em duas cepas de levedura “flor” durante o envelhecimento do vinho xerez e obtiveram 70,54 ng/min.mg de proteína de AATase que sintetiza acetato de etila e 60,73 ng/min.mg de esterase que hidrolisa o acetato de isoamila, isto antes da aeração e depois de 2 horas de aeração do vinho obteve 130,12 ng/min.mg. Segundo Rojas *et al.* (2002), em *Saccharomyces cerevisiae* e outras leveduras, a síntese de ésteres ocorre por via intracelular pelo processo de catálise da álcool acetil transferases (AATases) que utiliza energia de tioésteres provenientes da acetil coenzima A. Três tipos de álcool acetil transferases catalisam a síntese de acetato de etila, n-hexanoato de etila e acetato de isoamila. Em contraste, a éster sintase (esterase reversa) tem sua atividade limitada para a produção de ésteres: dois ésteres têm sido relatados em produtos de panificação e cerveja, foram produzidos caprilato de etila e acetato de etila, respectivamente. Estes autores realizaram estudos para avaliar a atividade de álcool acetil transferase e éster hidrolase em extratos de levedura e obtiveram uma atividade de AATase para *S. cerevisiae* de 34,3 $\mu\text{mol/mg}$, 4,5 $\mu\text{mol/mg}$ para *P. anomala* e 0,57 $\mu\text{mol/mg}$ de éster sintase, também com *P. anomala*.

De acordo com Yoshioka e Hashimoto (1981) a formação de ésteres por fungos depende primeiramente da reação reversa das esterases ou álcool acetil

transferase, sugerindo que a formação de acetato de isoamila depende exclusivamente da ação da álcool acetil transferase, sendo que a formação de acetato de etila depende da ação de ambas, da álcool acetil transferase e da reação reversa das esterases. Estes autores também observaram a formação de acetato de etila a partir do etanol e ácido acético somente pela reação reversa das esterases (Tabela 6).

Tabela 6: Produção de ésteres acetato pela ação da AATase e esterase durante a fermentação por leveduras

Ésteres Acetato	Substrato	<i>Saccharomyces uvarum</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levedura do Saquê	Levedura do Vinho	<i>Hansenula anomala</i>
Acetato de isoamila (ppm)	Álcool isoamílico, acetil CoA	78	38	81	42	2
	Álcool isoamílico, ácido acético	0	0	0	0	27
Acetato de etila (ppm)	Etanol, Acetil CoA	13	9	9	5	191
	Etanol, Ácido acético	7	10	6	9	396

Fonte: Yoshioka e Hashimoto, 1981.

Torres *et al.* (2009) utilizaram esterase do tipo II (Esterase S-86 de *Bacillus licheniformis*) para catalisar a esterificação de 3-metil 1-butanol em acetato de isoamila, com aumento de 42,8% na produção em 24 horas de reação. Panda e Gowrisishankar (2008) otimizaram variáveis importantes para a síntese de esterases por *Saccharomyces cerevisiae*, no qual a composição do meio consistiu em uma mistura de dextrose, peptona, extrato de levedura e extrato de malte. A Tabela 7 apresenta resultados deste e outros autores que também produziram esterases com diferentes microorganismos.

Tabela 7: Produção de esterases por diferentes microorganismos

Microorganismo	Esterase	Atividade	Referência
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MTCC 36	Intracelular Esterase	0,29 U/mg de proteína	Panda <i>et al</i> (2008)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Intracelular Esterase	0,016 U/mg de proteína	Degrassi <i>et al</i> (1999)
<i>Ophiostoma piceae</i>	Extracelular Esterase	55 um/ml	Calero-Rueda <i>et al</i> (2002)
<i>Bacillus subtilis</i> NRRL 365	Extracelular Esterase	4,5 U/ml	Meghji <i>et al</i> (1990)
<i>Lactobacillus casei</i> CL96	Esterase	0,46 U/ml	Choi e Lee (2001)
<i>Pediococcus pentosauces</i> SV 61	Intracelular Lipase-esterase	80 U/mg de proteína	Ostdal <i>et al</i> (1996)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Esterase	7,8 U/ml	Christakopoulos <i>et al</i> (1998) Topakas <i>et al</i> (2003)
<i>Sporotrichum thermophile</i>	Feruloyl esterase	156 mU/mg de proteína (FES)	
<i>Aspergillus niger</i>	Feruloyl esterase Cinnamoyl esterase	0,4 nkat/ml 0,049 nkat/ml	Asther <i>et al</i> (2002)
<i>Fusarium proliferatum</i> NRRL 26517	Feruloyl esterase	0,334 U/ml	Shin e Chen (2006)

Adaptado de Panda e Gowrisishankar (2008).

2.3.3.3 Lipase

Lipase é o nome genérico para um grupo de enzimas pertencentes à classe das hidrolases (E.C. 3.1) e que atuam sobre ligações éster (E.C. 3.1.1). As triacilglicerol lipases (E.C.3.1.1.3), cuja definição clássica descreve estas enzimas como glicerol éster hidrolases que atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol (Jaeger *et al.*, 1994) (Figura 2). Constitui uma classe especial entre as carboxil éster hidrolases (Egloff *et al.*, 1995), ou seja, o papel fisiológico das lipases é hidrolisar os triglicerídeos em diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos e glicerol. Além da sua função natural de hidrolisar éster carboxílico, podem catalisar reações de esterificação, interesterificação e transesterificação em meio não aquoso.

Devido a esta versatilidade, estas têm grande potencial em indústrias de alimentos, detergentes, farmacêutica, couros, têxtil, cosméticos e de papel. As

lipases também têm sido utilizadas em processamento de alimentos no desenvolvimento de aromas e no controle de qualidade com o objetivo de modificar o aroma através da síntese de ésteres de cadeia curta de ácidos graxos e alcoóis. As de diferentes origens microbianas são utilizadas em refinarias de arroz, modificam o leite de soja e para aumentar e acelerar a fermentação de vinhos de maçã. Também podem ser utilizadas em indústria para resolver problemas de misturas racêmicas e na produção de polímeros biodegradáveis (HASAN *et al.*, 2006).

Com objetivo de produzir compostos de aromas naturais, Mahapatra *et al.* (2009) utilizaram lipase de microorganismos considerado “GRAS” (*Generally Recognized as Safe*), ou seja, totalmente seguros para o homem e para os animais, assim como os insumos por eles produzidos, que são amplamente empregados em diversos processos industriais, como catalisador para síntese de ésteres (componentes de aroma). Neste estudo, realizou-se a síntese de dois ésteres de cadeia curta (acetato de n-butila e acetato de n-propila), componentes de aroma de frutas utilizando a lipase produzida pelo microorganismo *Rhizopus oligosporus* NRRL 5905 imobilizadas, para facilitar o processo “downstream” com concentração de 25% de enzima, (15 U/ml) em 24 horas de reação. Fernandes *et al.* (2007) obtiveram rendimento de 94% na síntese de ésteres com uma relação molar álcool-ácido de 5:1 quando adicionaram 60 U de lipase de *Burkholderia cepacia*. Sun e Xu (2008) utilizaram a lipase de *Rhizophus chinensis* para a conversão de aromas de cadeia curta, ácido caprílico (C8) e ácido caprílico (C10) em octanoato de etila e caproato de etila, respectivamente, ambos com aumento de 95% na produção. Dheeman *et al.* (2011) mostraram que a lipase de *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 é estável na presença de solventes orgânicos e é capaz de sintetizar acetato de isoamila a partir de n-hexano e álcool isoamílico com adição de ácido acético em 72 horas de reação. Macedo, Lozano e Pastore (2003) utilizaram lipase de *Rhizophus sp* para síntese de ésteres de citronelila (butirato de citronelila, acetato de citronelila) em meio livre de solvente, com aumento na produção de 95% e 60% respectivamente. Buttery, Shahidi e Teranishi (1989) afirmaram que é possível obter forte aroma de coco pela

formação de 6-pentil – α –pirona através de vias enzimáticas produzidas pelo fungo *Trichoderma reesei* e forte aroma de pêssego pela produção de lactonas (4 – decanolideo e cis – 6 – dodeca – 4 – olideo) pelo fungo *Sporobolomyces odoratus*. Industrialmente a produção de L-mentol, maior constituinte de óleo de hortelã-pimenta, é realizada utilizando uma lipase microbiana, L-metil-éster hidrolase, (Schereier, 1997; Pandey *et al.*, 2008). Neto, Pastore e Macedo (2004), utilizaram lipases de *Geotrichum fragrans* e *Geotrichum sp* para hidrolizar óleo de rícino e produzir a γ -decalactona um dos compostos responsável pelo impacto no aroma de frutas e derivados de chocolate.

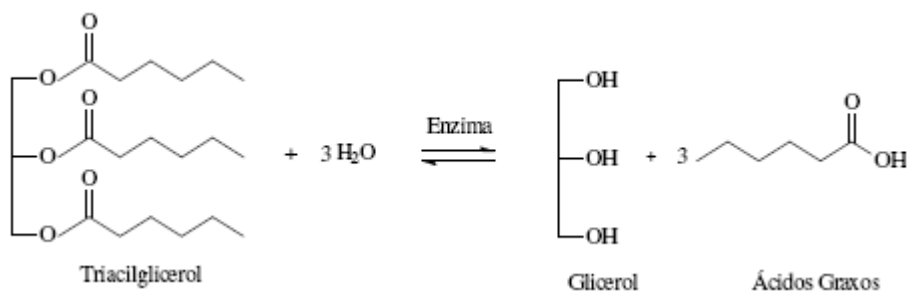


Figura 2: Reação de hidrólise catalisada por triacilglicerol lipases.
 FONTE: FENNEMA, 1993

Entretanto, as lipases se diferenciam pela capacidade de catalisar não só reações de hidrólise, mas também de síntese em meios aquo-restritos, como reações de esterificação, interesterificação, transesterificação, alcoólise e aminólise, e por atuar sobre substratos não naturais (JAEGER e EGGERT, 2002).

Vários autores estudaram a diferenciação das lipases (E.C.3.1.1.3) e esterases (E.C.3.1.1.1) sendo que ainda não foram bem definidas as diferenças entre estas enzimas. Autores como Sarda e Desnuelle (1958) diferenciaram as lipases a partir de sua característica cinética, pois estas têm a propriedade de ativação na presença de substratos insolúveis em água e emulsionados, como ésteres emulsionados, enquanto as esterases não apresentariam esta ativação, apenas catalisariam reações na presença de substratos solúveis em água, exercendo assim sua função hidrolítica. Estudos com lipase pancreática humana

(WINKLER *et al.*, 1990) de *Rhizomucor miehei* (BRADY *et al.*, 1990) e de *Geotrichum candidum* (SCHRAG e CYCLER, 1997) foram importantes na determinação da estrutura tridimensional, da enzima. O fenômeno da ativação interfacial passou a ser uma propriedade importante para a caracterização da lipase, no qual o sítio ativo recoberto por uma “tampa” hidrofóbica ao interagir com a interface lipídeo/água destas enzimas ficaria exposto para reação ao sofrer uma mudança conformacional na sua estrutura.

Porém, Jaeger e Reetz (1998) provaram que lipases de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* B, apresentam a “tampa” em sua estrutura, mas não sofrem ativação interfacial.

Ferrato *et al.*(1997) afirmaram que a presença ou não da ativação interfacial pode ser influenciada pelos substratos utilizados e pelas condições experimentais.

As lipases e esterases também podem ser diferenciadas pela especificidade de cada enzima pelo substrato. Os substratos naturais para lipases são óleos e gorduras contendo triacilgliceróis de cadeia longa constituídos de ácidos graxos, ligações éster tríplexes. Os substratos para esterases possuem ligações éster únicas, no qual a enzima atua liberando ácidos graxos de baixa massa molar (BROCKMAN, 1984).

Jaeger *et al.*(1999); Ferrato *et al.*(1997); Verger (1997); Egloff *et al.*(1995) e Jaeger *et al.*(1994), definiram as lipases como carboxilesterases que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa (cadeia acila com mais de 10 átomos de carbono), e esterases são enzimas que hidrolisam acilgliceróis de cadeia com menos de 10 átomos de carbono. O primeiro autor citado (JAEGER *et al.*, 1999), enfatiza que a maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, enquanto o inverso não ocorre.

Algumas das lipases mantêm a sua atividade em solventes orgânicos apolares. Assim podem ser usadas na hidrólise de ésteres insolúveis em água, como na resolução de misturas racêmicas por meio da hidrólise estereoespecífica. Estas também têm sido utilizadas para adição em alimentos com o objetivo de modificar o sabor pela síntese de ésteres de ácidos graxos de cadeia curta e alcoóis, que são conhecidos como compostos de aromas e fragrâncias. No

processo de produção do chá preto que utilizam métodos de desidratação, quebra mecânica e fermentação enzimática, as lipases produzidas por *Rhizomucor miehei* diminuem a formação de ácidos graxos polinsaturados, reduzindo assim os lipídeos totais formados e favorecendo a formação de voláteis aromáticos, além de melhorar a qualidade do chá (HASAN *et al.*, 2006).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral a produção de aromas frutais por *Ceratocystis fimbriata* cultivado em resíduos e subprodutos da agroindústria: polpa cítrica, farelo de soja e melaço de cana como substratos da FES.

3.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho visaram:

- Testar duas cepas de *C. fimbriata* para produção de voláteis totais em polpa cítrica;
- Otimizar a produção de compostos de aromas e voláteis totais por FES;
- Determinar a melhor composição do substrato que favoreça a produção de aromas por FES, suplementando a polpa cítrica com outras fontes de carbono e nitrogênio;
- Acompanhar o perfil enzimático de poligalacturonase (pectinase), esterases e lipase durante a produção de aromas;
- Relacionar a atividade das enzimas lipase, esterases e poligalacturonase com a concentração de voláteis totais durante a FES.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microorganismos e Preparo do Inóculo

Duas cepas de *Ceratocystis fimbriata* (CBS 374.83 e CBS 146.53) foram testadas neste estudo. As cepas liofilizadas foram adquiridas do banco de cepas *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (Holanda). Após reativação, as cepas foram mantidas em BDA (Batata Dextrose Ágar) e estocadas sob refrigeração a 4°C.

O inóculo foi preparado após 7 dias de cultura em frascos de Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 ml de BDA de mantidos a 30°C. Os esporos foram coletados em água deionizada esterilizada contendo duas gotas de *Tween* 80. A suspensão foi agitada em agitador magnético com auxílio de pérolas de vidro. A determinação da concentração de esporos na suspensão foi realizada por contagem em câmara de “*Neubauer*”.

Os frascos foram inoculados com a suspensão de esporos com concentrações variáveis entre 1×10^6 , 10^7 , 10^8 esporos/g de substrato.

4.1.2 Seleção de cepa

Foram testadas as cepas *Ceratocystis fimbriata* (CBS 374.83 e CBS 146.53), estas após preparo da suspensão de esporos conforme item 4.1 foram inoculadas em polpa cítrica (0,8-2,0 mm) em frascos de Erlenmeyers, com umidade inicial de 65%, taxa de inóculo de 10^6 esporos/ grama de substrato e a FES ocorreu em estufa a 30°C durante 7 dias. A cada 24 horas a partir do tempo zero, foram analisados os “headspace” em cromatógrafo gasoso da marca SHIMADZU modelo 17A.

4.2 Preparo do substrato

A polpa cítrica peletizada, proveniente da empresa CARGILL AGRÍCOLA S.A. (São Paulo, SP) foi moída e seca em estufa com circulação de ar a 65°C por 24 horas. O substrato assim preparado foi classificado granulometricamente para se obter partículas entre 0,8 e 2,0 mm.

O farelo e o melaço de soja foram fornecidos pela empresa IMCOPA S.A. (Araucária, PR). O farelo de soja foi classificado granulometricamente para se obter partículas entre 0,8 e 2,0 mm.

O melaço de cana proveniente da usina Cerradinha (Catanduvas, PR). O melaço de soja e de cana foram pesados de acordo com o teor de açúcares redutores utilizados (15 ou 20%) e solubilizados em água.

Todos os substratos utilizados foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Os experimentos foram analisados conforme fluxograma mostrado na Figura 3.

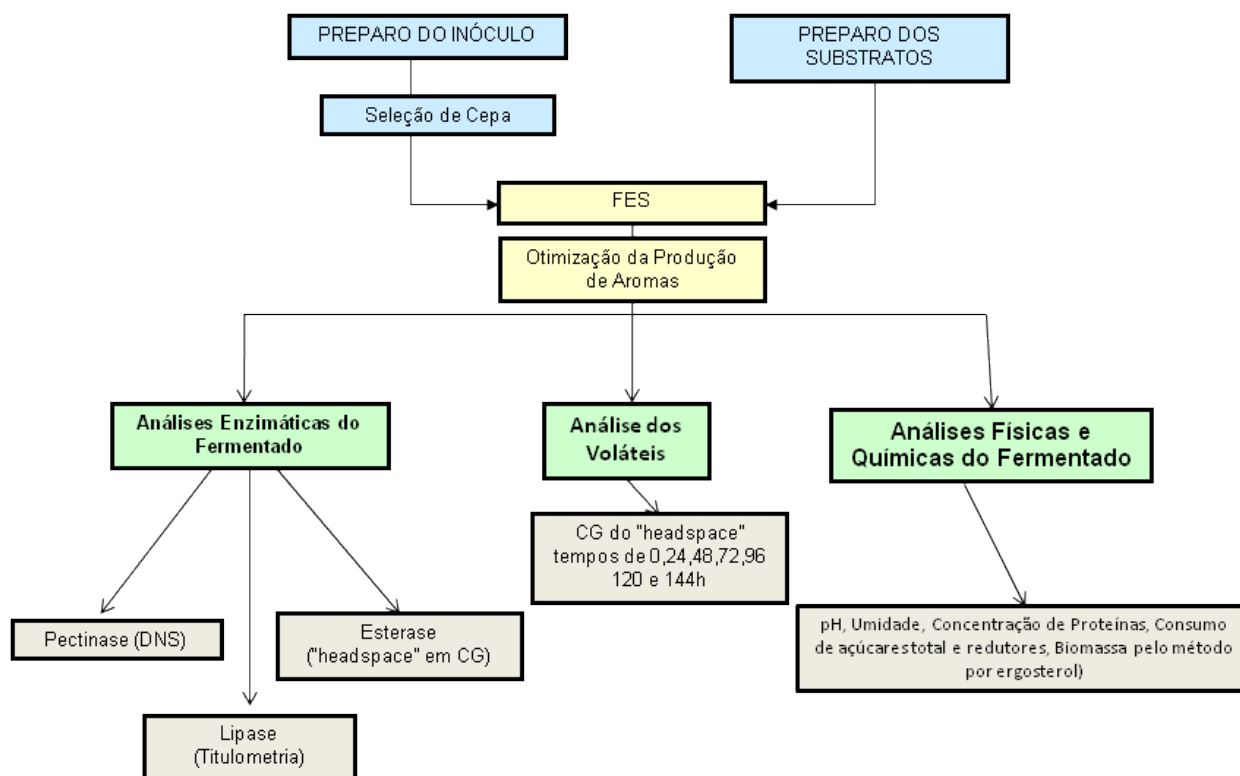


Figura 3: Fluxograma das etapas realizadas durante a FES para produção de aromas naturais pela cepa *C. fimbriata*

4.3 FES

A produção de aromas por FES foi realizada em frascos de Erlenmeyer (250 mL) contendo 15 g de substrato autoclavado a 121°C por 15 minutos. O pH inicial foi ajustado com NaOH 0,1N ou HCl 0,1N entre 4,0 e 8,0 conforme o experimento. A umidade da polpa foi ajustada entre 65 e 75%.

4.4 Otimização da Produção de Aromas

Planejamentos experimentais foram utilizados para estudar como os principais fatores influenciam a produção de aromas por FES, utilizando o programa Statistica ® versão 5.0. Ensaios foram realizados com o objetivo de estudar os possíveis efeitos das variáveis do processo fermentativo, além de

estabelecer modelos estatisticamente válidos para descrever as interações existentes entre as variáveis do processo e os resultados, utilizando para a análise destes resultados a Metodologia de Superfície de Resposta (BARROS-NETO *et al.*, 1995).

4.4.1 Primeiro Planejamento Experimental

Um primeiro planejamento fatorial incompleto com 5 fatores em 2 níveis (2^{5-2}) com duas repetições do ponto central foi aplicado (Tabela 8). As seguintes variáveis independentes foram estudadas: pH, umidade, temperatura, taxa de inóculo e granulometria. Os níveis estudados para pH foram 4,0(-1), 5,0(0) e 6,0 (+1), para umidade foram 65% (-1), 70% (0) e 75% (+1), para temperatura 28°C (-1), 30°C (0) e 32°C (+1), taxa de inóculo 10^6 (-1), 10^7 (0) e 10^8 (+1) e granulometria menor que 0,8 mm (-1), entre 0,8 a 2,0 (0) e maior que 2,0 mm (+1).

Tabela 8: Primeiro Planejamento fatorial 2^{5-2} com duas repetições no ponto central para as variáveis pH, umidade, taxa de inóculo, temperatura e granulometria

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Taxa de inóculo	Umidade (%)	Granulometria (mm)
1	+1	+1	+1	+1	+1
2	+1	+1	-1	+1	-1
3	+1	-1	+1	-1	+1
4	+1	-1	-1	-1	-1
5	-1	+1	+1	-1	-1
6	-1	+1	-1	-1	+1
7	-1	-1	+1	+1	-1
8	-1	-1	-1	+1	+1
9	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0

4.4.2 Segundo Planejamento Experimental

Um segundo planejamento experimental fatorial completo 2^2 com 6 ensaios e 2 repetições nos pontos centrais foi realizado. Neste planejamento foram

testados a taxa de inóculo e o pH. A temperatura, umidade e granulometria foram fixadas conforme resultados do primeiro planejamento. Os níveis estudados neste planejamento para pH foram 6,0(-1), 7,0 (0) e 8,0 (+1) e para taxa de inóculo 5×10^6 (-1), 10^7 (0) e 5×10^7 (+1) (Tabela 9).

Tabela 9: Segundo Planejamento fatorial 2^2 com duas repetições no ponto central

Ensaio	pH	Taxa de inóculo
1	+1	+1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	-1	-1
5	0	0
6	0	0

4.4.3 Testes da Suplementação da FES com Fontes de Carbono e Nitrogênio

Visando melhorar as condições nutritivas do meio para o cultivo do microorganismo e, conseqüentemente, a produção de voláteis, os resíduos melaço de cana e melaço de soja foram testados como fontes de carbono. As concentrações testadas foram adição 15% e 20% de melaço de cana e 15% e 20% de melaço de soja em polpa cítrica. Realizou-se um teste também com duas fontes de nitrogênio (farelo de soja e uréia) variando proporções de farelo de soja e polpa cítrica entre 1:1, 1:3 e concentrações de 10 e 20% de uréia. Os melhores resultados foram utilizados para realização de um terceiro Planejamento Experimental para avaliar a interação entre os nutrientes. As demais condições físicas foram fixadas em pH 6,0, 75% de umidade, granulometria entre 0,8 a 2 mm e taxa de inóculo de 10^7 esporos/ g de substrato (conforme Planejamento Experimental 1 e 2).

4.4.4 Terceiro Planejamento Experimental

No terceiro planejamento experimental foram estudadas 3 variáveis em dois níveis, com 6 pontos axiais e 3 pontos centrais (DCCR, Tabela 10 e 11).

Concentrações de farelo de soja foram testadas como fonte de nitrogênio, melaço de cana como fonte de carbono e adição de solução salina de composição 18 g/L de KH_2PO_4 , 4g/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e 3g/L MgSO_4 conforme descrito por Christen e Raimbault (1991) com algumas modificações (Tabela 10) utilizando FES para produção de aromas por *Ceratocystis fimbriata*.

Tabela 10: Apresentação dos níveis decodificados e fatores para o terceiro Planejamento Experimental Completo (DCCR)

Fatores	Níveis				
	-1,68	-1	0	1	1,68
FS/PC	1:0,796	1:1	1:2	1:3	1:4,17
FS(g) /PC(g) - (1)	8,35:6,65	7,5:7,5	5:10	3,75:11,25	2,9:12,1
%MC - (2)	6,6	10	15	20	23,4
	1,6g	5g	10g	15g	18,4g
Solução Salina (g/L) - (3)					
KH_2PO_4	0,64	2,0	4,0	6,0	7,36
CaCl_2	0,16	0,5	1,0	1,5	1,34
MgSO_4	0,36	1,0	3,0	5,0	6,36

Onde: PC=polpa cítrica, FS=farelo de soja, MC=melaço de cana

Tabela 11: Matriz com os níveis codificados dos experimentos para o terceiro Planejamento

Ensaio	Experimental Completo		
	FS	MC	SS
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

4.4.5 Quarto Planejamento Experimental

O quarto e último planejamento experimental composto central (DCCR) com 2 fatores em 2 níveis, 4 pontos axiais e 3 repetições no ponto central foi realizado para definir as melhores condições de produção de voláteis totais, excluindo a adição de solução salina que não apresentou resultados significativos em estudo anterior, diminuindo assim a necessidade de muitos aditivos, conseqüentemente, diminuindo custos de produção (Tabela 12 e 13).

Tabela 12: Apresentação dos níveis e fatores para o quarto Planejamento Experimental Completo

Fatores	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
FS (g)	7,18	8,0	10	12	12,82
MC (g)	1,47	2,5	5,0	7,5	8,53

Onde: FS = farelo de soja e MC = melaço de cana

Tabela 13: Matriz de experimentos para o quarto planejamento experimental completo

Ensaio	Farelo de Soja	Melaço de Cana
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	-1,41	0
6	1,41	0
7	0	-1,41
8	0	1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0

4.5 Análises dos Voláteis

Os voláteis produzidos foram identificados e quantificados por cromatografia gasosa a partir da análise do “*headspace*” do cultivo nos tempos 0, 24, 48, 72, 96 horas ou até que se observasse uma diminuição na produção de voláteis. O equipamento utilizado foi um cromatógrafo a gás da marca Shimadzu, modelo GC17A e equipado com coluna HP-DB 5 (30 m x 0,32 mm) e detector de ionização de chama. As temperaturas do injetor e detector foram mantidas a 230 °C. A temperatura do forno foi programada inicialmente para 40°C durante 5 minutos, sendo aumentada a uma taxa de 20°C/min até a temperatura final de 150 °C, que foi mantida durante 4 minutos. Como gás de arraste foi utilizado nitrogênio a uma vazão de 1,5 mL/min, e uma taxa de *split* de 1:5. As amostras do “*headspace*” foram retiradas por meio de uma seringa própria para gases.

A concentração de voláteis foi calculada a partir de uma curva-padrão de etanol. A curva-padrão de etanol foi obtida da seguinte forma: quantidades conhecidas de etanol foram adicionadas a um recipiente volumétrico contendo um septo, utilizado para obtenção de curvas padrões. O frasco foi deixado em estufa a 30 °C durante 15 minutos para vaporização do etanol. Em seguida, foram tomadas amostras do *headspace* com uma seringa própria para gases e quantificadas por cromatografia gasosa. Conhecendo-se a densidade e o peso molecular do etanol,

foi calculada a concentração de etanol no “*headspace*” do balão em $\mu\text{mol/L}$. Plotando-se a concentração versus a área obtida por cromatografia gasosa obteve-se a equação da curva. A identificação dos compostos por cromatografia foi feita através da comparação do tempo de retenção dos compostos presentes no “*headspace*” dos cultivos com o tempo de retenção de diferentes padrões puros (Interchim, França) injetados nas mesmas condições de análise (Tabela 14).

Tabela 14: Tempo de Retenção dos Padrões e Valor do “*Threshold*”

Padrões	Tempo de Retenção (min)	“ <i>Threshold</i> ” ($\mu\text{g/L}$)
Acetaldeído	1,86	952
Álcool etílico*	1,97	53000
Acetato de etila*	2,65	8,5
Acetato de isopropila	3,51	-
Propionato de etila	4,39	-
Acetato de propila	4,12	-
Álcool isoamílico	4,38	-
2-metil-1-butanol	4,96	-
Isobutirato de etila	5,21	15
2-hexanona	6,18	-
2-hexanol	6,33	800
Butirato de etila	6,21	-
Acetato de isobutila	5,63	-
Acetato de butila	6,48	-
Acetato de isoamila	7,62	30
Propionato de isobutila	7,83	-
2-heptanona	7,97	-
2-octanona	9,52	-
2-octanol	9,57	-

Fonte: Nogueira-Pato (2009) e * Soares (1998) para valores de “*Threshold*”
 Obs. Os tempos de retenção foram obtidos a partir da análise dos padrões em CG no presente estudo

4.5.1 Determinação de “OAV” (*Odour Activity Value*)

O “OAV” foi calculado através da relação entre a concentração de um composto individual pelo seu “threshold”. O “threshold” indica o limite da percepção do composto pelo nariz humano e possui valores fixos encontrados na literatura e já listados na Tabela 14.

4.6 Análises Físicas e Químicas do fermentado

A umidade foi determinada por infravermelho (*Top Ray - Infrared Moisture Balance*). O pH foi determinado com potenciômetro digital a partir da suspensão de 5 g do fermentado ou substrato em 50 mL de água deionizada em agitação magnética durante 10 minutos.

Os açúcares foram medidos através do método de Somogyi-Nelson (1952). Os açúcares redutores foram determinados adicionando aproximadamente 1 g de fermentado a um frasco junto a 50 mL de água. A mistura foi levada a banho-maria fervente por 10 minutos. O volume foi completado para 100 mL e filtrado. Em um tubo de ensaio, foi adicionado 1 mL da solução de amostra e 1 mL do reativo A de Somogyi-Nelson e a mistura foi aquecida por 10 minutos em banho-maria. Após o resfriamento, 1 mL do reativo B de Somogyi-Nelson B e 7 mL de água foram adicionados. Procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 535 nm. Os açúcares totais foram determinados seguindo procedimento semelhante, porém submetendo a amostra de aproximadamente 1 g à hidrólise. A mistura foi levada a banho-maria por 20 minutos e após o resfriamento, foi neutralizada com solução de hidróxido de sódio 40% (g/mL). A seguir, procedeu-se de maneira semelhante. Um tubo branco foi preparado contendo água no lugar da amostra.

A biomassa foi determinada indiretamente através da dosagem de ergosterol presente na membrana celular de fungos. O ergosterol foi extraído em hexano e analisado por cromatografia líquida de alta “*performance*”- HPLC (SEITZ *et al*, 1979 com algumas modificações).

A dosagem de proteínas durante os cultivos e nos testes preliminares de caracterização enzimática foi realizada de acordo com o método proposto por Bradford (1976). Um mL de reagente de Bradford foi adicionado a 100 µL de extrato bruto, e a mistura colocada em temperatura ambiente (25°C) por cinco minutos. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 595 nm. A concentração foi calculada por comparação com uma curva padrão de BSA (proteína albumina bovina).

4.6.1 Análises Enzimáticas do Fermentado

Nesta etapa utilizou-se a cepa *Ceratocystis fimbriata* CBS 374.83 e como substrato utilizou-se uma mistura de polpa cítrica com granulometria entre 0,8 mm e 2,0 mm (10 g), farelo de soja (12 g) e melaço de cana-de-açúcar (7,5 g). O farelo de soja foi adicionado como fonte de nitrogênio, já que a polpa cítrica possui baixo teor protéico.

A fermentação no estado sólido foi realizada em frascos de Erlenmeyers de 250 mL, com pH inicial ajustado para 6,0. A umidade inicial do meio foi ajustada em 75%. As condições iniciais da fermentação foram estabelecidas através de planejamentos experimentais (dados já publicados em ROSSI *et al*, 2009).

Os frascos foram autoclavados a 121°C por 15 minutos, e a suspensão de esporos foi inoculada em concentração de 10^7 esporos/g de substrato (farelo de soja + polpa cítrica). A fermentação ocorreu em estufa a 30°C durante um período máximo de 120 horas.

4.6.1.1 Atividade de Pectinases (Poligalacturonases)

A extração para as análises enzimáticas foi realizada com água, tampão citrato pH 4,0 ou 5,0. A extração da enzima foi feita utilizando 5g de fermentado e 30 mL de água ou tampão. A mistura foi agitada por 15 minutos em agitador magnético e filtrada em seguida. Esse extrato foi denominado extrato bruto.

A análise da presença de pectinase (poligalacturonase) foi feita de forma similar à realizada por Alexandrino *et al* (2007) e descrita por Jayani, Saxena e

Gupts (2005). Segundo o método colorimétrico do DNS, 0,9 mL de solução de pectina cítrica 0,5% em tampão citrato 0,1 M pH 4,0 ou 5,0 foi incubado por 5 min a 50°C. Em seguida, 0,1 mL do extrato enzimático foi adicionado e a mistura foi incubada por 15 min a 50°C. 1 mL de DNS (ácido dinitrosalicílico) foi adicionado e a mistura foi fervida por 5 min, em seguida 5 mL de água foram adicionados. A leitura de absorbância foi feita em espectrofotômetro a 540 nm. A concentração de açúcares redutores foi determinada através de uma curva padrão de ácido galacturônico.

A absorbância obtida para as amostras foi descontada do tubo branco, que foi preparado da seguinte forma: 0,9 mL de solução de pectina cítrica 0,5% em tampão citrato 0,1 M pH 4,0 ou 5,0 foi incubado por 20 min a 50°C. Em seguida, 0,1 mL do extrato enzimático e 1 mL de DNS (ácido dinitrosalicílico) foram adicionados e a mistura foi fervida por 5 min, em seguida 5 mL de água foram adicionados.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de ácido galacturônico/minuto nas condições do ensaio (Blandino e Dravillas, 2001). Dessa forma, foi calculada a atividade do extrato bruto em termos de U/ g de fermentado.

4.6.1.2 Atividade de esterase

Determinou-se a presença de esterase, pela formação de acetato de etila e acetato de isoamila por reação reversa segundo modificação do método utilizado por Yoshioka e Hashimoto (1981). O meio reacional consistiu de 2,5 mL de tampão acetato pH 5,0 contendo 15 mM de álcool etílico de pureza absoluta para CG e 15 mM de álcool isoamílico também de pureza absoluta para CG, 7 mM de cloreto de magnésio e 1 g de fermentado.

Amostras dos fermentados foram testadas de 0 a 72 horas. As amostras foram congeladas e também se testou amostras secas por 24 horas a 45°C. A mistura foi incubada sob leve agitação por 60 minutos a 25°C em frasco de reação de 10 mL, contendo tampa de silicone. O acetato de etila e acetato de isoamila foram determinados por CG em “*headspace*”. Uma unidade de esterase foi

definida como a quantidade capaz de produzir 1 μmol de acetato de etila e acetato de isoamila por minuto.

4.6.1.3 Atividade de lipase

Primeiramente verificou se esta cepa era produtora de lipase pela presença ou não de halos fosforescentes visualizados quando irradiada ao UV 365 nm, após inoculadas em placa de Petri contendo PDA, corante Rodamina B (0,1%) e azeite de oliva (5%) de acordo com Fernandes *et al.*, (2006).

O método utilizado para os ensaios de atividade lipolítica foi o método titulométrico frente ao substrato natural trioleína. A determinação da atividade de lipases por titulometria foi baseada no método proposto por Stuer, Jaeger e Winkler (1986), com modificações. O método baseia-se na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima a partir dos triacilgliceróis (trioleína). Para análises o fermentado foi congelado durante 48 horas em congelador horizontal (-18 °C) para interromper o crescimento microbiano e em seguida seco em estufa a 45 °C por 24 horas.

O substrato trioleína (62 mmol/L) da marca Sigma – Aldrich foi utilizado em que foi preparada uma emulsão com goma arábica (3%, m/v), CaCl_2 (2 mmol/L), tampão Tris-HCl (2,5 mmol/L, pH 7,25) e NaCl (150 mmol/L) (TISS, CARRIERE e VERGER, 2001). Esta emulsão foi misturada durante uma hora em agitador mecânico. A massa de 1g (0,035 $\text{mg}_{\text{ptn}}/\text{mL}$ tampão) do fermentado contendo a enzima foi adicionado a 20 mL da emulsão sob agitação magnética (300 rpm) no próprio frasco de reação (capacidade de 50 mL e termostatizado) a 25°C; a reação foi seguida por 10 min. A unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de promover a liberação de um (1) μmol de ácidos graxos por minuto. Para o cálculo da atividade, foi utilizado um fator de correção para cada valor de pH utilizado durante as reações, devido a dissociação parcial dos triacilgliceróis (trioleína) o qual possui um valor de pKa de 6,8 (CHAHINIAN *et al.*, 2005).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção de Cepa

As fermentações realizadas com as cepas CBS 374.83 e 146.53 apresentaram produção de compostos voláteis, mas a cepa CBS 374.83 foi mais eficiente, pois o início da produção de aromas foi em torno de 48 horas, sendo que a cepa CBS 146.53 demorou em torno de 72 horas (Figura 4 e 5). Estas fermentações foram realizadas nas seguintes condições: pH=6,0, umidade=65%, taxa de inóculo= 10^6 esporos /grama de substrato e granulometria entre 0,8 a 2,0mm.

Durante as análises cromatográficas foram identificados oito compostos voláteis (Tabela 15). Sendo que etanol, acetato de etila e acetaldeído, foram os principais compostos produzidos.

Tabela 15: Compostos voláteis presentes no “headspace” do *C. fimbriata* CBS 374.83 em FES após 48 horas de cultura.

Picos	TR (min)	Compostos
1	1,868	acetaldeído
2	1,97	Álcool etílico
3	2,651	Acetato de etila
4	4,123	Acetato de propila
5	5,207	Isobutirato de etila
6	6,169	2-hexanona
7	6,334	2-hexanol
8	7,625	Acetato de isoamila

5.2 Valores de “OAV”

Na Tabela 16 os resultados de OAV indicam que praticamente todos os componentes identificados são diretamente importantes para o aroma de banana, principalmente acetato de isoamila e acetato de etila, com valores de 48,31 e 7815,01. Em contraste, têm-se o hexanol e acetaldeído que podem estar contribuindo indiretamente para o aroma de frutas, pois tiveram OAV menores que

1. Tressl e Jennings (1972) e Soares (1998), afirmaram que os principais componentes do aroma de banana são: acetato de etila, etanol, acetato de propila, acetato de isobutila, butirato de etila e acetato de isoamila. Sendo que, neste estudo estavam presentes no “*headspace*” dos cultivos todos os compostos responsáveis pelo impacto do aroma de banana já citados acima (Tabela 14 e 15). Os maiores valores de OAV foram para acetato de isoamila e acetato de etila, componentes importantes para o aroma característico de banana madura. LOSADA *et al.* (2011) obtiveram um OAV de 30 para o acetato de isoamila nos compostos de aroma do vinho branco Godello.

Tabela 16: Valores de “OAV” calculados a partir dos resultados obtidos para produção de compostos voláteis por *C. fimbriata* CBS 374.83 cultivado em polpa cítrica, farelo de soja e melaço de cana.

Composto	Concentração (µg/L)	Odor característico	“OAV”
Acetato de Isoamila	1449,63	Frutas/banana	48,31
Acetato de etila	66428,33	Frutas/banana	7815,01
Isobutirato de etila	239,88	Frutas/morango	15,99
Hexanol	158,02	Vegetais/grama	0,197
Etanol	81083,2	Frutas/banana	1,529
Acetaldeído	53,35	Grama/maçã verde	0,056

A Figura 4 mostra os resultados da concentração de voláteis totais obtidos com as cepas testadas *C. fimbriata* (146.53 e 374.83), onde a primeira cepa produziu uma concentração máxima de voláteis totais menor (49,8 µmol/L.gs) em maior tempo (72 horas) comparada com a cepa utilizada nos experimentos seguintes, CBS 374.83, o qual nesta fermentação sua produção máxima de voláteis totais foi de 74,62 µmol/L.gs em 24 horas de FES (Figura 4).

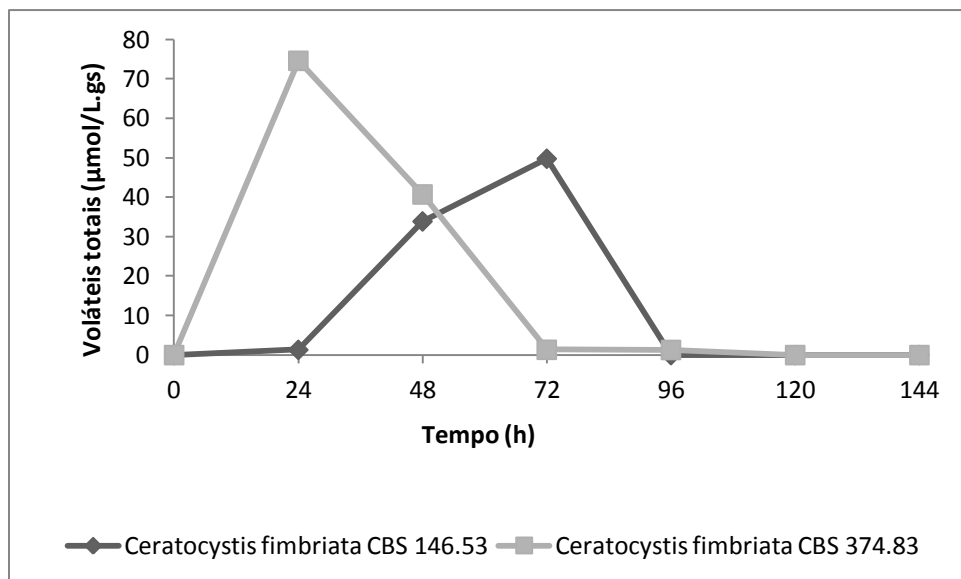


Figura 4: Voláteis totais produzidos pelas cepas *Ceratocystis fimbriata* CBS 146.53 e 374.83 em polpa cítrica por FES

5.3 Primeiro Planejamento Experimental:

Para esta primeira etapa foram testadas as variáveis físico-químicas: pH, umidade, temperatura, taxa de inóculo e granulometria. Através da análise do diagrama de Pareto (Figura 5), observa-se que a temperatura ótima dentro dos níveis estudados tende ser a máxima, mas neste estudo fixou-se a temperatura para FES em 30°C conforme estudos anteriores para este microorganismo (Medeiros *et al.*, 2003).

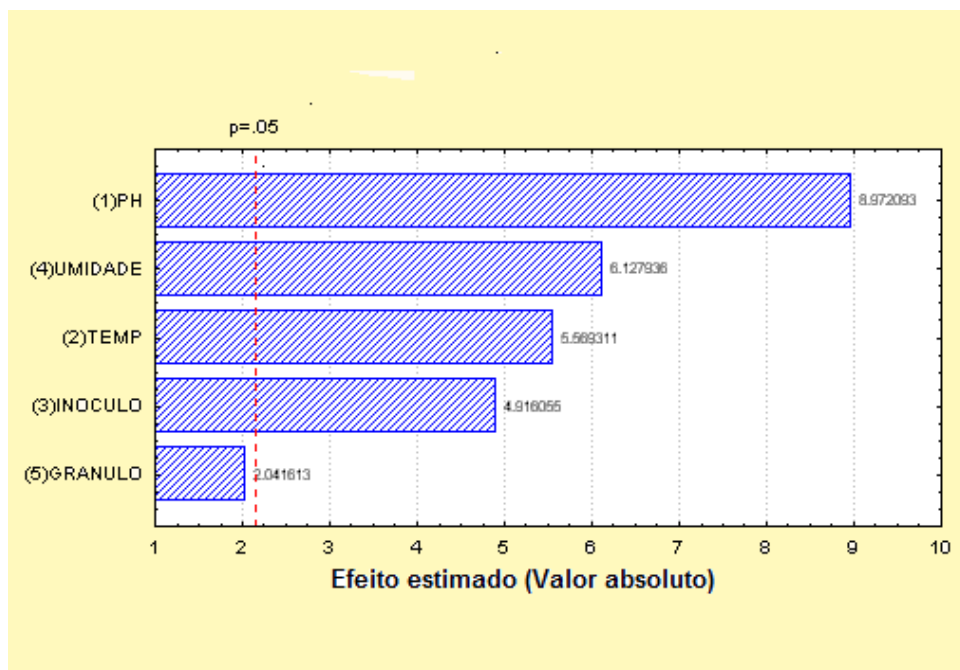


Figura 5: Diagrama de efeitos de Pareto para o primeiro planejamento 2^{5-2} para o primeiro estudo. Fatores: pH,umidade, temperatura, taxa de inóculo e granulometria.Variável dependente: concentração de voláteis totais.

A granulometria conforme Figura 6 não foi significativa. Esta foi fixada entre 0,8 a 2,0mm, porque substratos com partículas muito pequenas tornam-se muito compactadas durante a FES dificultando assim as trocas gasosas do microorganismo com o meio, e substratos com partículas maiores dificultariam a absorção de nutrientes pelo microorganismo. Já a umidade também foi significativa e conforme diagrama de Pareto (Figura 6) estudos ainda devem ser realizados com valores maiores, porém com valores acima de 80%, verificou-se a presença de água livre no meio, descaracterizando assim a FES (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003). Então se optou pela umidade 75% que era a absorção máxima de água pelo substrato. As variáveis taxa de inóculo e pH foram significativas e devem ser estudadas nos próximos planejamentos com valores maiores que no primeiro estudo. Assim, neste primeiro estudo, as variáveis granulometria, umidade e temperatura foram fixadas.

Os resultados de Anova (Tabela 17) confirmam os resultados apresentados no diagrama de Pareto, pois a razão p foi menor que 0,05 para as variáveis pH,

umidade, temperatura, taxa de inóculo (variáveis significativas) e maior que 0,05 ($p=0,06$) para granulometria (variável não significativa).

Tabela 17: Anova da otimização das variáveis: pH, umidade inicial, temperatura, taxa de inóculo e granulometria.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Médias quadradas	Razão f	Razão p
(1) pH	$1,24 \times 10^{12}$	1	$1,24 \times 10^{12}$	80,49846	$3,52 \times 10^{-7}$
(2) Temperatura	$4,79 \times 10^{11}$	1	$4,79 \times 10^{11}$	31,01723	$6,91 \times 10^{-5}$
(3) Inóculo	$3,73 \times 10^{11}$	1	$3,73 \times 10^{11}$	24,16759	0,000227
(4) Umidade	$5,8 \times 10^{11}$	1	$5,8 \times 10^{11}$	37,5516	$2,6 \times 10^{-5}$
(5) Granulo	$6,44 \times 10^{10}$	1	$6,44 \times 10^{10}$	4,168183	0,060504

$R^2 = 0,51392$ Onde: f = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra; p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%)

5.4 Segundo Planejamento Experimental Fatorial Completo

Neste planejamento foram testados a taxa de inóculo e o pH, em dois níveis e três pontos centrais. Conforme diagrama de Pareto (Figura 6) o pH foi significativo com intervalo de confiança de 95%, a taxa de inóculo e a interação de pH com taxa de inóculo não apresentaram significância.

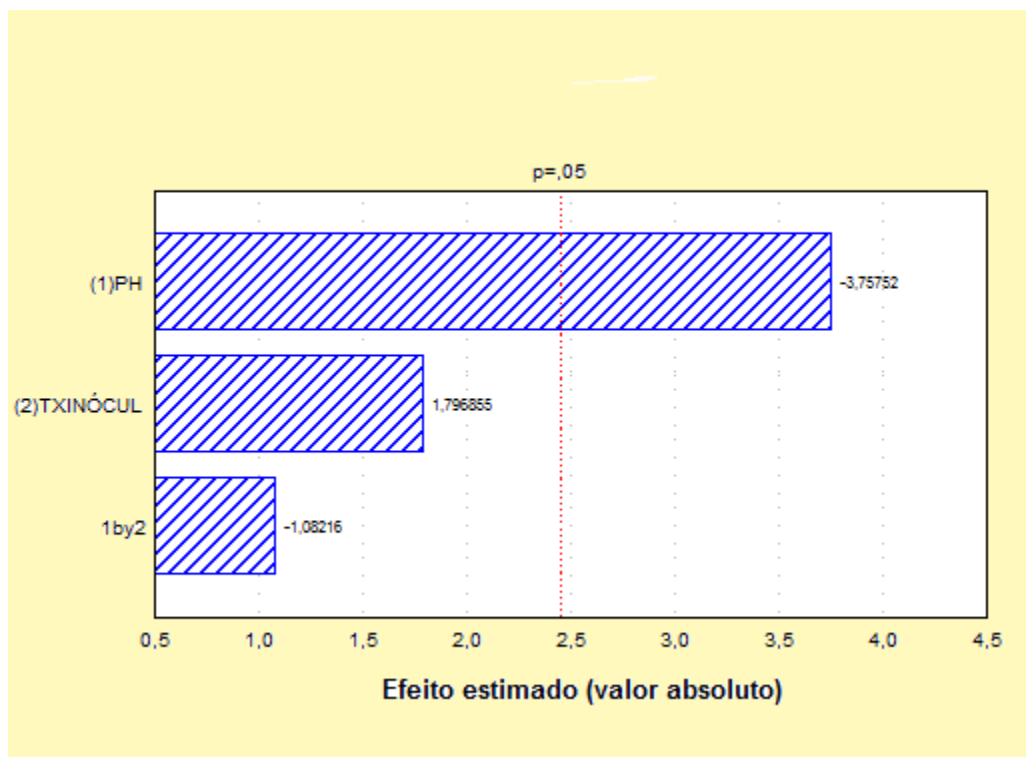


Figura 6: Diagrama de efeitos de Pareto para o segundo planejamento 2^2 . Variável dependente: concentração de voláteis totais.

Os resultados mostram que o pH foi significativo na produção de voláteis negativamente, ou seja, com o aumento do pH diminui-se a produção de voláteis. Em planejamento anterior o pH ótimo já tinha sido alcançado entre 5,0 e 6,0, sendo assim optou-se pelo pH 6,0 para FES com polpa cítrica seguindo estudos para produção de aromas com *C. fimbriata* em FES realizados por Medeiros *et al.* (2006). A taxa de inóculo não apresentou significância, pois conforme planejamento anterior as variáveis estudadas deveriam ser maiores que 10^8 esporos/gs para este estudo, porém as condições para produção de esporos nesta concentração não era viável, pois seria necessária uma quantidade muito grande de meio para o crescimento do microorganismo ou um volume de inoculação muito grande por grama de substrato. Fixou-se a taxa de inóculo de 10^7 esporos/gs conforme Medeiros *et al.* (2006). Os resultados de Anova (Tabela 18) confirmam o diagrama de Pareto, pois a razão p somente foi menor que 0,05 para o fator pH e resultados da razão F maiores que 12 também para o pH (1), sendo maiores que 0,05 para taxa de inóculo (2) e interação de 1 com 2 e razão F menor

que 12 para taxa de inóculo e interação de 1 com 2. Isto não quer dizer que a taxa de inóculo não é importante para FES, esta só não foi significativa durante este estudo, pois o intervalo entre os níveis pode não ter sido definido adequadamente.

Tabela 18: Resultado de Anova para o segundo Planejamento Experimental Completo (2^2)

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Médias quadradas	Razão F	Razão p
(1) pH	$9,11 \times 10^{11}$	1	$9,11 \times 10^{11}$	14,11898	0,009426
(2)Tx.inóculo	$2,08 \times 10^{11}$	1	$2,08 \times 10^{11}$	3,228688	0,122485
(1) com (2)	$7,56 \times 10^{10}$	1	$7,56 \times 10^{10}$	1,171063	0,320745

$R^2 = 0,75529$; onde: F = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro das amostras; p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%); R^2 = coeficiente de determinação para o ajuste do modelo a superfície de resposta

5.5 Testes da Suplementação da FES com Fontes de Carbono e Nitrogênio

Para a otimização da adição de compostos nutrientes foram testados como fonte de carbono os resíduos melaço de cana e de melaço de soja nas concentrações de 15% e 20%. Os melhores resultados foram utilizados para realização de um terceiro Planejamento Experimental para avaliar a influência desses fatores e a interação entre os nutrientes.

A melhor concentração de voláteis totais foi obtida com a adição de 15% do melaço de cana. A produção de voláteis totais, acetato de etila e acetato de isoamila foram de aproximadamente $55 \mu\text{mol/L.gs}$, $22 \mu\text{mol/L.gs}$ e $0,12 \mu\text{mol/L.gs}$, respectivamente (Figuras 7, 8 e 9). Maiores concentrações de melaço de cana inibiram a produção de compostos de aroma e a adição de melaço de soja não foi adequada para este fim.

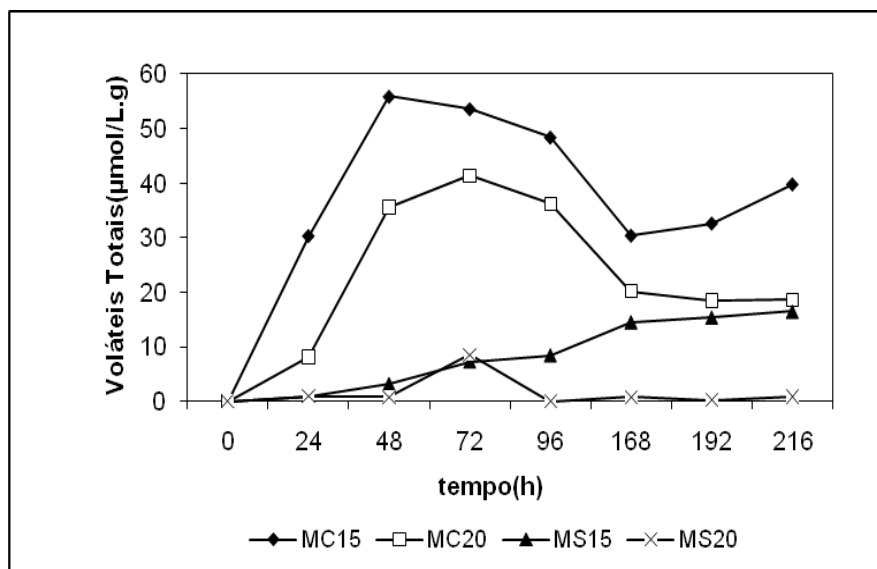


Figura 7: Concentração de voláteis totais variando as concentrações de 15 e 20 % de melaço de cana (MC) e melaço de soja (MS).

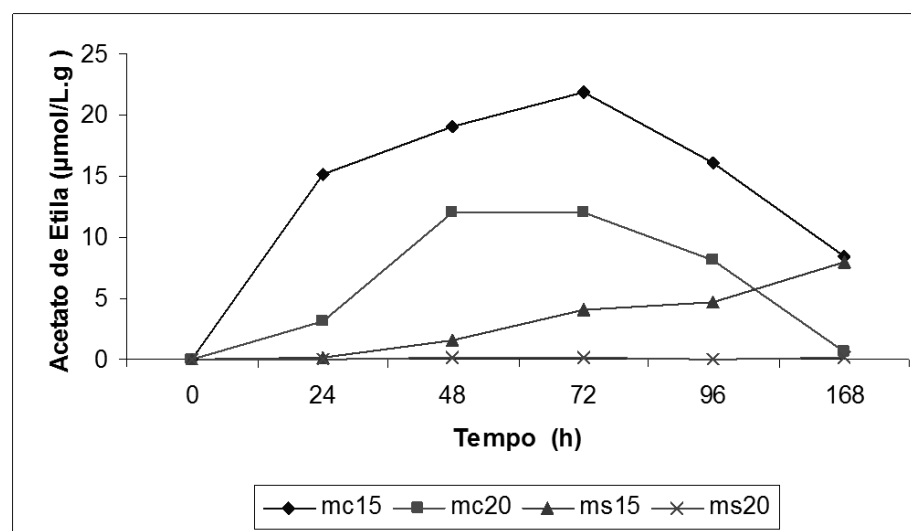


Figura 8: Concentração de acetato de etila variando as concentrações de 15 e 20 % de melaço de cana (mc) e melaço de soja (ms).

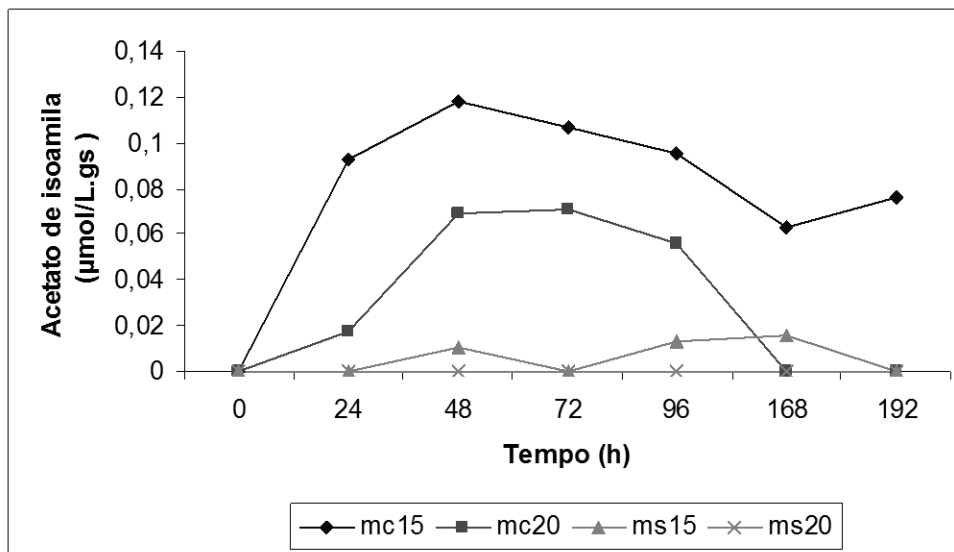


Figura 9: Concentração de acetato de isoamila variando as concentrações de 15 e 20% de melaço de cana (mc) e melaço de soja (ms)

No teste com duas fontes de nitrogênio (farelo de soja e uréia), utilizou-se proporções de farelo de soja e polpa cítrica de 1:1 e 1:3, e concentrações de 10 e 20% de uréia em relação à polpa cítrica. Os melhores resultados foram obtidos com farelo de soja na proporção de 1:3 em relação à polpa cítrica. A produção de voláteis totais foi de aproximadamente 70 µmol/L.g em 24 horas de FES e de aproximadamente 3 µmol/L.g com adição de 20% de uréia no meio (Figura 10). Talvez o farelo contenha outros nutrientes importantes para o desenvolvimento do microorganismo em relação à uréia, o que pode explicar uma menor produção de voláteis totais durante a FES. A partir destes resultados foram realizados estudos com planejamento experimental para adequar a proporção dos nutrientes adicionados ao substrato.

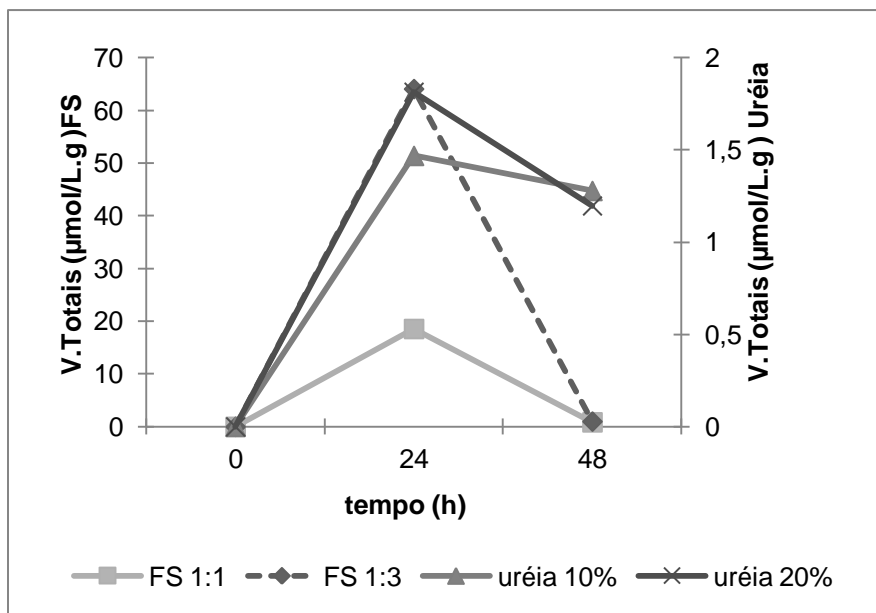


Figura 10: Evolução de Voláteis Totais durante FES com adição de diferentes concentrações de nitrogênio (N) no substrato (PC)

5.6 Terceiro Planejamento Experimental

Para finalizar o estudo de otimização da produção de voláteis, foram testadas concentrações de farelo de soja como fonte de nitrogênio, melaço de cana como fonte de carbono e adição de solução salina num planejamento composto central rotacional (DCCR), com um total de 17 ensaios. Observa-se que a produção de voláteis totais em 48 horas de FES foi maior no ensaio de número 2 (101,92 µmol/L.g), porém a produção de acetato de isoamila (éster importante para o aroma característico de banana) foi maior no ensaio número 1 com concentração de 1,43 µmol/L.g contra 0,63 µmol/L.g do resultado do ensaio número 2, mais do que o dobro. Sendo assim, optou-se pelos resultados do ensaio número 1 no qual a produção de voláteis totais também foi alta, em torno de 88,91 µmol/L.g (Tabela 19).

Tabela 19: Resultados do terceiro Planejamento Experimental Completo incluindo concentração de voláteis totais, acetato de etila e acetato de isoamila como variáveis dependentes.

Ensaio	FS	MC	SS	Voláteis Totais	Acetato de Etila	Acetato de isoamila
				($\mu\text{mol/L.gs}$)	($\mu\text{mol/L.gs}$)	($\mu\text{mol/L.gs}$)
1	-1	-1	-1	88,91	65,55	1,43
2	1	-1	-1	101,92	77,17	0,64
3	-1	1	-1	64,56	38,19	0,16
4	1	1	-1	62,73	29,95	0,19
5	-1	-1	1	85,10	66,92	0,81
6	1	-1	1	80,49	62,14	0,39
7	-1	1	1	61,89	35,00	0,20
8	1	1	1	53,18	22,34	0,21
9	-1,68	0	0	65,76	38,88	0,25
10	1,68	0	0	65,59	41,05	0,21
11	0	-1,68	0	13,95	4,64	0,08
12	0	1,68	0	30,47	6,31	0,08
13	0	0	-1,68	31,70	4,35	0,11
14	0	0	1,68	30,01	0,611	0,03
15	0	0	0	33,93	3,46	0,11
16	0	0	0	23,23	0,68	0,02
17	0	0	0	25,36	0,68	0,01

Já para o éster, acetato de etila, obteve-se melhores resultados no ensaio de número 2, mas também com mínima diferença na produção de voláteis totais com o ensaio número 1 (aproximadamente 77,17 $\mu\text{mol/L.gs}$ e 65,55 $\mu\text{mol/L.gs}$).

Com análise dos resultados do diagrama de Pareto (Figura 11) percebe-se que a única variável significativa foi a adição de farelo de soja (quadrática) com valores de p acima de 0,05. A adição de solução salina e de melaço de cana não apresentou significância (linear e quadrática) neste estudo para valores de p acima de 0,05, porém considerando estudos anteriores sabe-se que a adição de melaço de cana e de farelo de soja, são fatores importantes que influenciam na produção de compostos de aroma durante a FES.

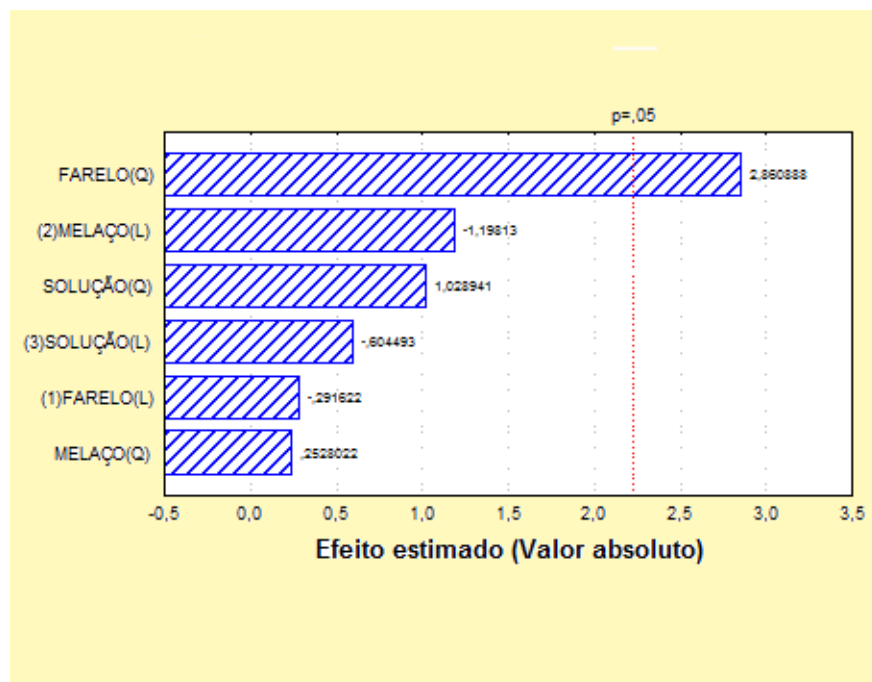


Figura 11: Diagrama de Pareto apresentando resultados do terceiro planejamento composto central com 17 ensaios, para avaliação dos fatores farelo de soja, melaço de cana e solução salina.

Os resultados de Anova (Tabela 20) confirmam a significância de farelo de soja (quadrática), com valor da razão p inferior a 0,05, sendo as outras variáveis quadráticas e lineares superiores a 0,05.

Tabela 20: Resultados de Anova para o Planejamento Composto Central(DCCR)

Fator	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Médias Quadradas	Razão F	Razão p
(1) FS (L)	55,88522	1	55,88522	0,085044	0,776535
FS (Q)	5378,453	1	5378,453	8,184679	0,016931
(2)MC (L)	943,3314	1	943,3314	1,435518	0,258491
MC (Q)	41,9969	1	41,9969	0,063909	0,805542
(3) Sol. Salina (L)	240,1257	1	240,1257	0,365412	0,558981
Sol. Salina (Q)	695,7231	1	695,7231	1,058719	0,327752

$R^2 = 0,51392$, onde: F = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro das amostras; p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%); onde FS= farelo de soja, MC=melaço de cana e Sol. Salina = solução salina

5.7 Quarto Planejamento Experimental

O resultado do quarto planejamento composto central (DCCR) não apresentou significância para nenhuma das variáveis, todos os valores de p foram abaixo de 0,05 (Figura 12). Entretanto, os resultados da análise de superfície (Figuras 13 e 14) mostram que as faixas das variáveis estudadas já chegaram a uma região ótima de produção de voláteis totais. Sendo assim, as melhores proporções foram fixadas conforme o terceiro planejamento experimental - 12 g de farelo de soja, 10 g de polpa cítrica e 7,5 g de melaço de cana. Os resultados de Anova (Tabela 21) confirmam resultados do diagrama de Pareto com razão p maior que 0,05, indicando assim a não significância das variáveis.

Tabela 21: Resultados de Anova para o quarto Planejamento Composto Central (DCCR)

Fator	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Médias Quadradas	Razão F	Razão p
(1) FS (L)	$1,25 \times 10^{11}$	1	$1,25 \times 10^{11}$	3,12736	0,137224
FS (Q)	$5,76 \times 10^{10}$	1	$5,76 \times 10^{10}$	1,446801	0,282887
(2) MC (L)	$3,33 \times 10^{10}$	1	$3,33 \times 10^{10}$	0,837023	0,402216
MC (Q)	$1,13 \times 10^{10}$	1	$1,13 \times 10^{10}$	0,284708	0,61649
1L com 2L	$4,69 \times 10^8$	1	$4,69 \times 10^8$	0,011768	0,917835

$R^2 = 0,55434$ onde: F = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro das amostras; p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%); onde FS= farelo de soja, MC=melaço de cana

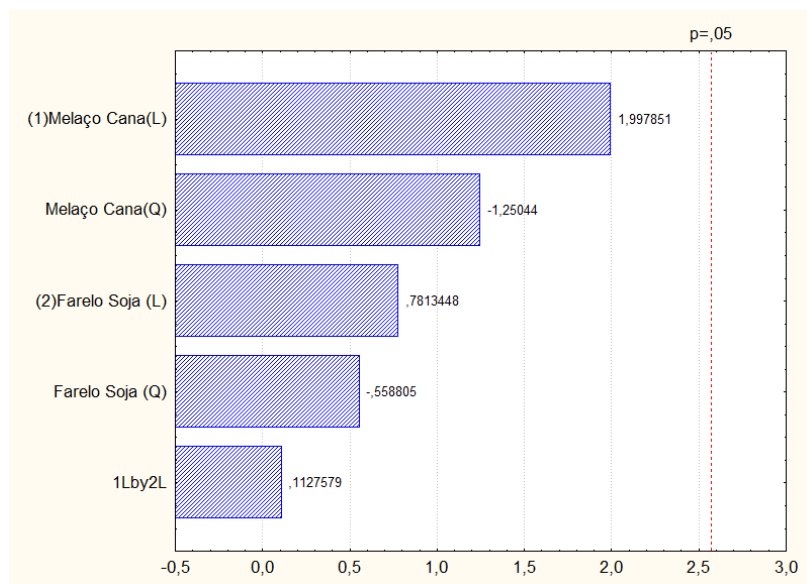


Figura 12: Diagrama de Pareto com resultados do quarto planejamento composto central

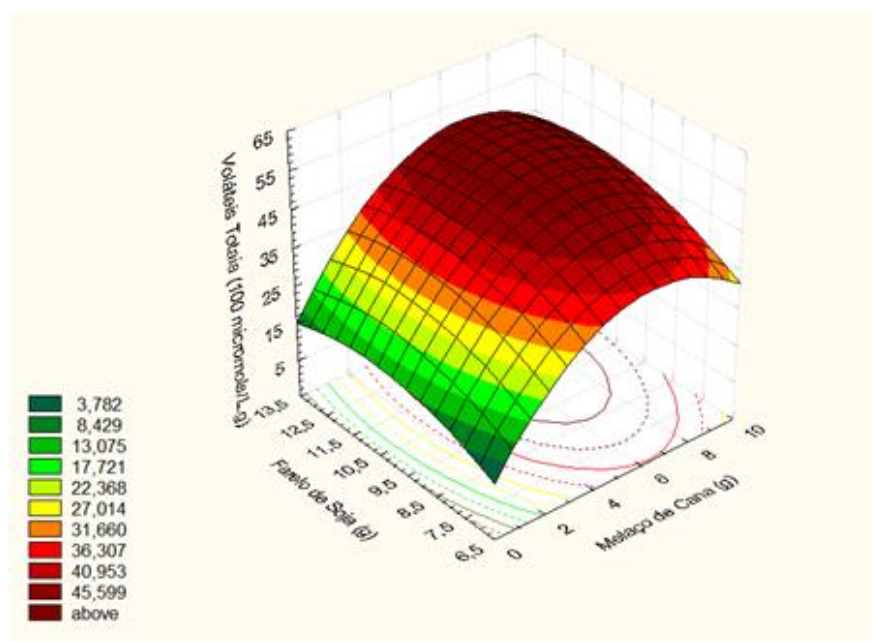


Figura 13: Superfície de resposta gerada com os resultados da última etapa da otimização da produção de voláteis totais durante FES com 11 ensaios

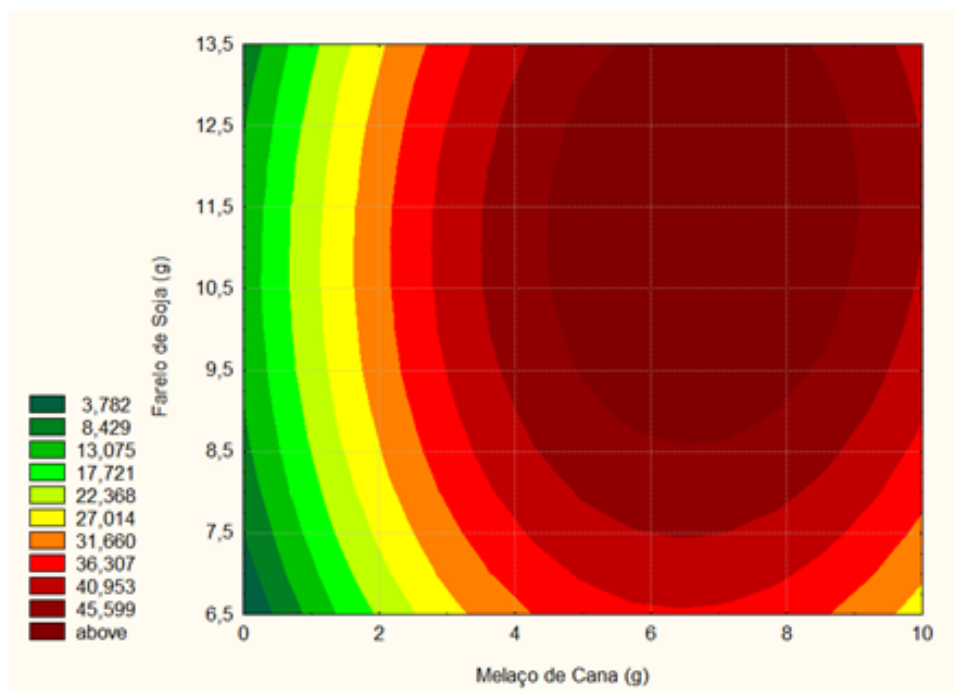


Figura 14: Superfície de resposta gerada com os resultados da última etapa da otimização da produção de voláteis totais durante FES

5.8 Produção de Aromas por FES e a Cinética da Produção de Voláteis Totais, das Condições Físico-Químicas e Biomassa

Observou-se que o perfil de produção de voláteis totais manteve-se constante, assim como o pH, o teor de umidade, a concentração protéica e o consumo de açúcares, embora as concentrações máximas de voláteis totais apresentassem variações entre as fermentações.

Após otimização do processo, o máximo valor obtido de voláteis totais foi de 99,75 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{gs}$ em 48 horas de fermentação (Figura 15).

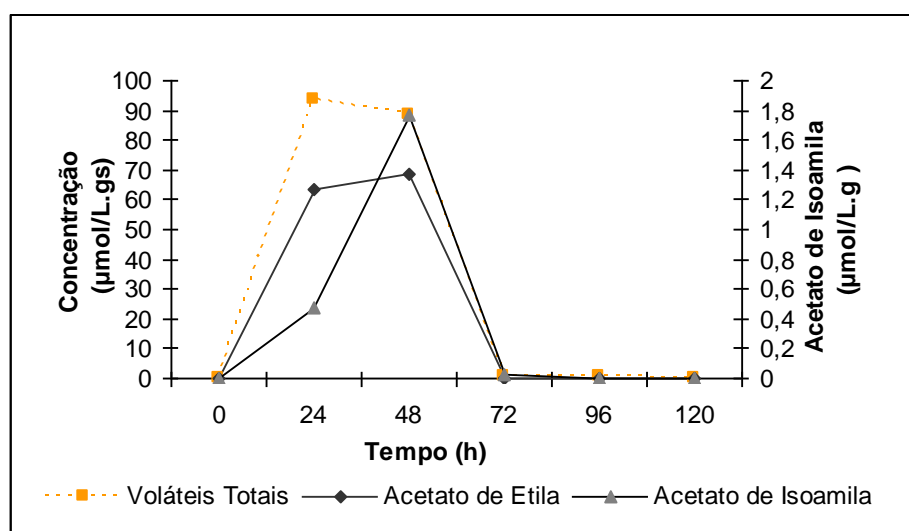


Figura 15: Evolução de Voláteis durante FES em condições otimizadas.

O estudo das condições físicas e químicas (Figura 20) mostra que na fermentação houve uma queda no consumo de açúcares totais até o tempo de 144 horas de FES de 85,82 mg/g a 11,72 mg/g, já os açúcares redutores apresentaram um leve aumento de 40 mg/g a 41,51 mg/g, explicando assim em uma primeira etapa de crescimento a quebra de açúcares totais em açúcares redutores e depois o seu consumo até 2,8 mg/g no tempo de 144 horas. O consumo de açúcares redutores apresentou o mesmo perfil durante todas as FES realizadas neste trabalho, inicialmente de 40 mg/g com leve aumento nas primeiras 24 horas devido o fungo estar degradando os açúcares totais em redutores e em seguida consumindo-os quase totalmente (concentração próxima a 0 g/L).

A concentração de proteínas se manteve constante entre 2,62 a 2,42 g/L até 72 horas de FES em seguida uma queda até 96 horas de 1,56 g/L e depois aumentou acentuadamente até 2,38 em tempo de 96 horas.

A umidade inicial variou durante a FES entre 74-76% aumentando até 79% (Figura 16). Observou-se este aumento, ao longo da fermentação, devido ao próprio processo de respiração, que resulta na liberação de água, que não é perdida para o meio, pois a fermentação é realizada em frascos com tampões de algodão que permitem a difusão. O pH inicial a 6,0, teve uma leve queda até aproximadamente 5,94 em 96 horas e depois um aumento para aproximadamente 7,0. Observou-se esta queda do pH nas primeiras 24 horas de fermentação possivelmente pela produção de compostos com características ácidas que podem estar relacionadas a produção de acetato de etila. Em seguida, o consumo da fonte de nitrogênio explicaria o aumento do pH até 144 horas de fermentação (Figura 16). Considerando estes resultados, esse microorganismo pode ser muito sensível ao pH do meio, pois quando ocorre quedas muito bruscas ou aumento do pH fora da faixa aceitável para o *C. fimbriata*, a produção de aromas já não se apresenta tão eficaz quanto em pH entre 5,9 a 6,0 (Figura 20).

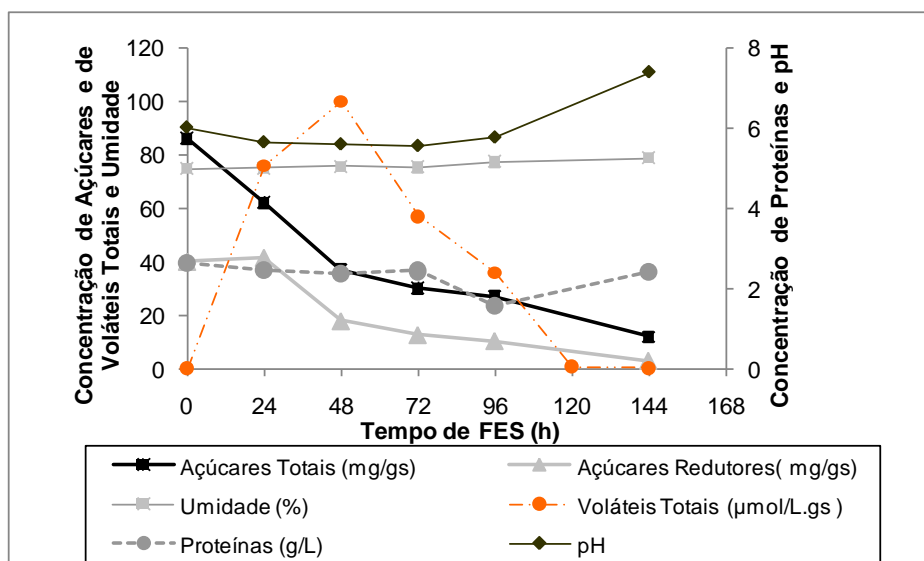


Figura 16: Cinética da Produção de Aromas por FES pela cepa *C. fimbriata* CBS 374.83, com resultados das análises de consumo de açúcares totais e redutores, concentração de proteínas, evolução do pH e umidade.

Obs. Onde gs (grama de substrato)

Na Figura 17 observa-se que a maior concentração de biomassa foi de 0,58 g/grama de substrato em 144 horas de fermentação, isto porque neste estágio da FES houve um crescimento muito grande e rápido devido à germinação de esporos com a formação de micélio. Porém a produção de componentes de aroma cai a praticamente zero, pois os açúcares simples utilizados na biossíntese de alcoóis e ésteres já foram consumidos. Além disso, o meio fica muito compactado e a troca de gases (respiração) se torna mais difícil. O mesmo observou-se na análise para proteínas (Figura 16), onde ocorreu uma leve queda entre o tempo de FES de 72-96 horas e em seguida de um aumento até 144 horas.

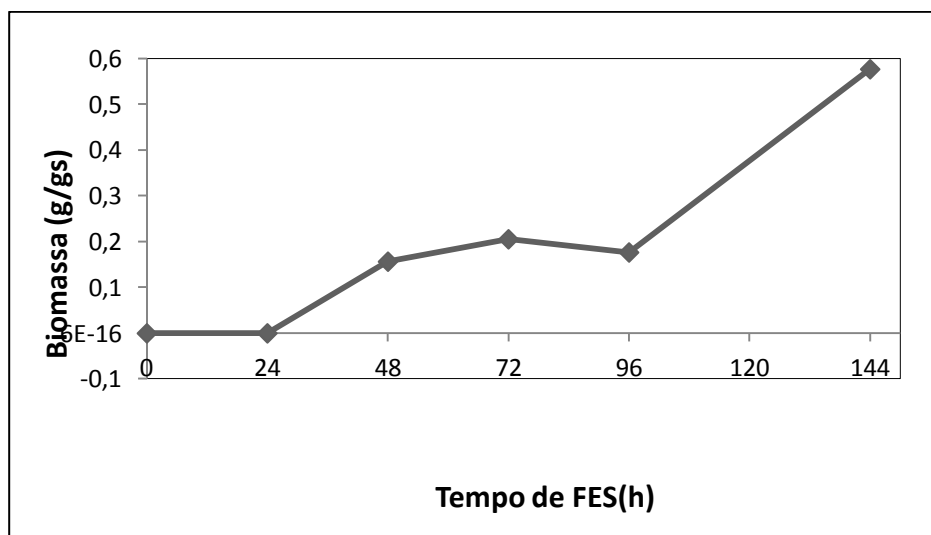


Figura 17: Evolução da Biomassa por método de dosagem do ergosterol por HPLC durante a produção de aromas por FES pela cepa *C. fimbriata* CBS: 374.83
Obs. Onde gs (grama de substrato)

Os resultados de voláteis totais obtidos em 48 horas de FES foram entre 99,75 a 101 $\mu\text{mol/L.gs}$ no meio composto por polpa cítrica, farelo de soja e melaço de cana. Foram superiores aos obtidos por outros autores, como Christen Meza e Revah (1997) que utilizaram o bagaço de mandioca como substrato para FES com *C. fimbriata* e obtiveram 48,4 $\mu\text{mol/L.gs}$ em 60 horas de fermentação. Christen *et al.*(2000) testaram a utilização de vários substratos (bagaço de mandioca, grão de soja, óleo de soja e bagaço de maçã), porém com *R. oryzae* e obtiveram um máximo 40 $\mu\text{mol/L.gs}$ em 36 horas e quando este adicionou a uma mistura destes substratos grãos de amaranto conseguiu 18,66 $\mu\text{mol/L.gs}$. Soares *et al.*, (2000)

obtiveram com *C.fimbriata* em FES utilizando casca de café adicionada de leucina uma concentração de voláteis totais de 32 $\mu\text{mol/L}$.gs em 280 horas de fermentação. Medeiros *et al.*(2000) obtiveram valor de voláteis totais de 30 $\mu\text{mol/L}$.gs em 30 horas de FES com a levedura *K. marxianus*. Medeiros *et al.*(2006) utilizando casca de café e polpa de café utilizando *C. fimbriata*, obtiveram 21,04 $\mu\text{mol/L}$.gs em tempos de 48 e 96 horas de FES respectivamente, os experimentos em colunas de fermentação melhoraram a produção de voláteis totais para 30,95 $\mu\text{mol/L}$.gs.

Os resultados do presente estudo podem contribuir com o desenvolvimento de novos produtos, já que a polpa cítrica e o farelo de soja mostraram-se interessantes para utilização para FES. A produção de aromas naturais pode ser viabilizada comercialmente, levando em conta que neste trabalho não foi necessário a adição de nenhum substrato de alto custo, apenas o uso de resíduos e subprodutos da agroindústria.

5.9 Atividades de Pectinase, Esterases, Lipase e Produção de Aromas

Nesta etapa do estudo, analisou-se a atividade de pectinase relacionando-a com a produção de aromas. Foram também realizados estudos de pH e melhores tampões para extração da enzima.

5.9.1 Obtenção do Extrato Bruto

A atividade de pectinase (poligalacturonase extracelular) foi medida conforme descrito no item 3.7.2. A atividade da enzima foi estudada em dois diferentes pH. Observou-se uma maior atividade da enzima poligalacturonase extracelular em tampão pH 5,0 que resultados obtidos em tampão citrato pH 4,0. (dados não apresentados). Também testou-se a extração do substrato fermentado em água e em tampão citrato pH 5,0 para análise enzimática, obteve-se os seguintes resultados: a atividade enzimática foi melhor quando extraída em

tampão pH=5,0 em torno de 3,5 U/g. A presença de pectinases era esperada no meio, uma vez que a polpa cítrica apresenta elevado teor de pectina (RODRIGUES, 2005). Segundo Richard e Hilditch (2009) a polpa cítrica apresenta um teor de pectina em torno de 20% em massa seca. No entanto, a atividade de pectinase obtida neste primeiro estudo (poligalacturonase extracelular) foi baixa (Figura 18), o que pode ser resultado do processo de extração enzimático ou de uma produção maior de outras enzimas, envolvidas diretamente no processo de produção de compostos de aroma.

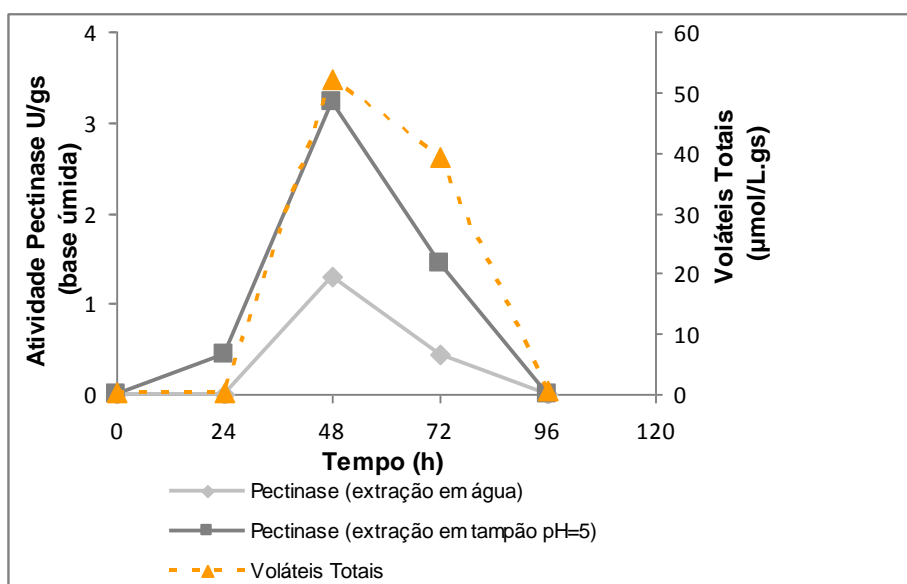


Figura 18: Atividade da pectinase com extração em água, em tampão e a produção de voláteis totais

Diversos autores estudaram a produção de pectinases empregando tampões de diferentes pH. Castilho e Medronhob (2000) estudou a atividade da enzima em pH 4,4, enquanto Sarvamangala e Dayanand (2006) e Blandino e Dravillas (2001) utilizaram pH 4,5, e Alexandrino *et al.*(2007) utilizaram pH 5,5. Canan *et al.* (2008) estudaram diversas faixas de pH, afirmando que dependendo da fonte microbiana a melhor atividade de poligalacturonase em geral encontra-se entre os valores de 3,5 e 5,5.

5.9.2 Resultados de Atividade Enzimática Quando Analisadas Somente em Polpa Cítrica e em Condições Otimizadas

A produção de pectinase foi maior nas condições otimizadas, que os resultados obtidos somente com polpa cítrica, aproximadamente 5 U/gs em polpa cítrica e 8 U/gs na condição otimizada (Figura 19). Nesta etapa do estudo foi possível verificar a presença de poligalacturonase extracelular no meio de cultivo durante o processo de fermentação de resíduos agro-industriais por *Ceratocystis fimbriata*. A enzima realiza a quebra das ligações glicosídicas entre resíduos de ácido D-galacturônico presentes na pectina, composto abundante na polpa cítrica. Dessa forma, os açúcares ficam disponíveis no meio para o crescimento do microrganismo e produção de compostos de interesse, dentre os quais estão os compostos de aroma como o acetato de isoamila. A atividade da enzima foi considerada baixa, o que indica que o fungo produz também outras enzimas com finalidade de disponibilizar os açúcares no meio, bem como enzimas envolvidas diretamente na produção de aromas. É indicada a necessidade de investigar outras enzimas que poderiam estar sendo produzidas pelo fungo, como esterases e lipases.

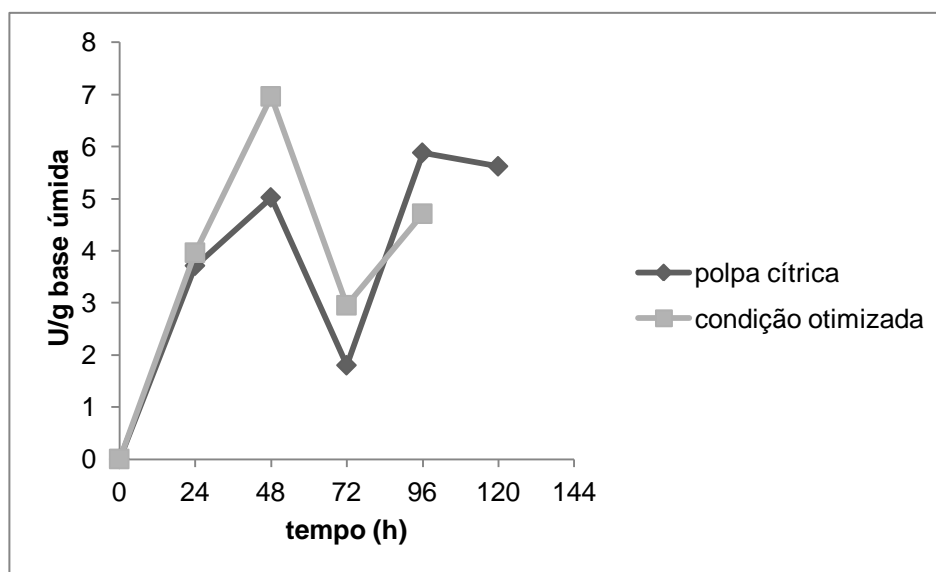


Figura 19: Comparação da atividade da pectinase durante FES com polpa cítrica como substrato e com polpa cítrica mais adição de nutrientes (condição otimizada)

5.9.3 Produção de Voláteis Totais e Pectinase

Com uma queda da produção de voláteis totais comparados com fermentação anterior 39,75 e aproximadamente 50 $\mu\text{mol/L}$.gs percebeu-se que a atividade enzimática aumentou acompanhando a linha de produção de voláteis (Figura 20), indicando assim que a produção de enzima pode estar relacionada indiretamente com a produção de compostos de aroma. Durante a produção de aromas por fermentação no estado sólido observou-se a produção de pectinase (poligalacturonase). A maior atividade observada foi de 59,59 U/g ou 17,46 μmol de ácido galacturônico/ml/min ou 17,46 U/ml em 48 horas de fermentação sendo que o pico da atividade enzimática coincide com o maior pico de produção de aromas totais nesta fermentação (Figura 20). Comparando com resultados de outros autores como Camargo *et al.* (2005) que com a utilização de bagaço de laranja utilizando *Aspergillus sp* em 48 horas obteve uma atividade de 3,6U/ml. Pastore e Uenojo (2006) obtiveram o máximo de 80 μmol de ac. galacturônico/ mL de extrato/ min. Blandino e Dravillas (2001) obteve atividade máxima de 0,05 μmol de ac. galacturônico/ mL de extrato/ min com *Asperillus awamori*, após 7 dias de fermentação. Zheng e Shetty (2000) obtiveram atividade máxima de 2,2 $\mu\text{mol/ mL/ min}$ (ou 29,4 U/g) após 40 dias de fermentação usando *Lentinus edodes*. Neste trabalho obteve-se resultados aproximadamente 2 vezes maior que Zheng e Shetty (2000), que utilizaram resíduos de laranja para produção de pectinase em FES, obtendo produtividade de 0,03 U/g.h. No presente estudo atingiu-se uma produtividade de 1,24 U/g.h de pectinase.

Considerando que o objetivo destes autores era a produção de pectinase, pois estes utilizaram meios e precursores específicos para esta enzima, a produção obtida neste trabalho foi consideravelmente boa, pois o objetivo era identificar a pectinase num meio otimizado e relacioná-la a produção de compostos de aroma.

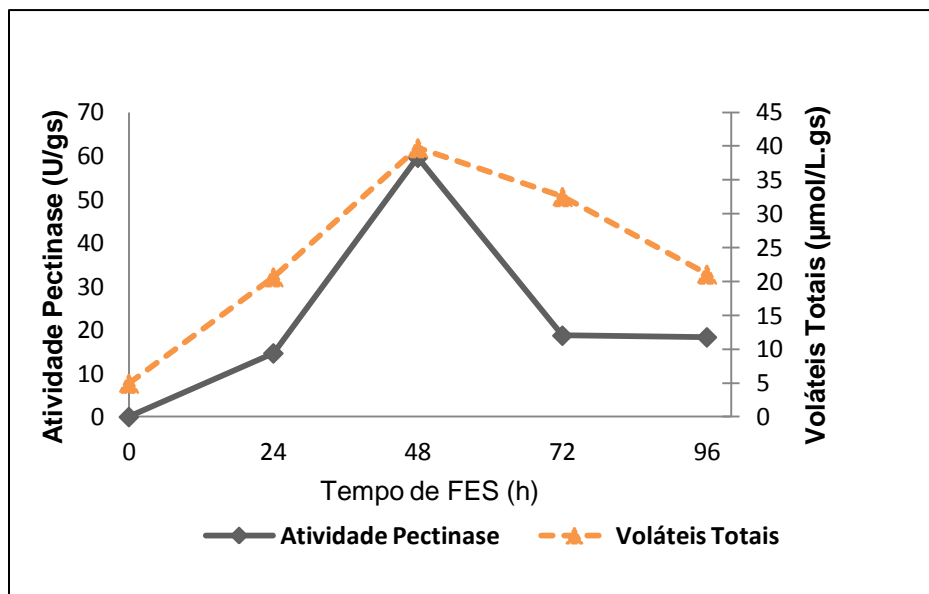


Figura 20: Atividade da pectinase e produção de voláteis totais durante FES na condição otimizada

Nesse período, observou-se também uma diminuição mais acentuada na concentração de açúcares totais no meio de cultivo, bem como o aumento da concentração de açúcares redutores (Figura 21). Há uma indicação que o crescimento do microrganismo nesse período está associado à produção de enzimas extracelulares, como a poligalacturonase. Tais enzimas possibilitam a quebra do substrato e liberação de açúcares redutores no meio, que podem ser posteriormente utilizados pelo fungo no processo de crescimento e produção de compostos de interesse, nesse caso, os componentes de aroma.

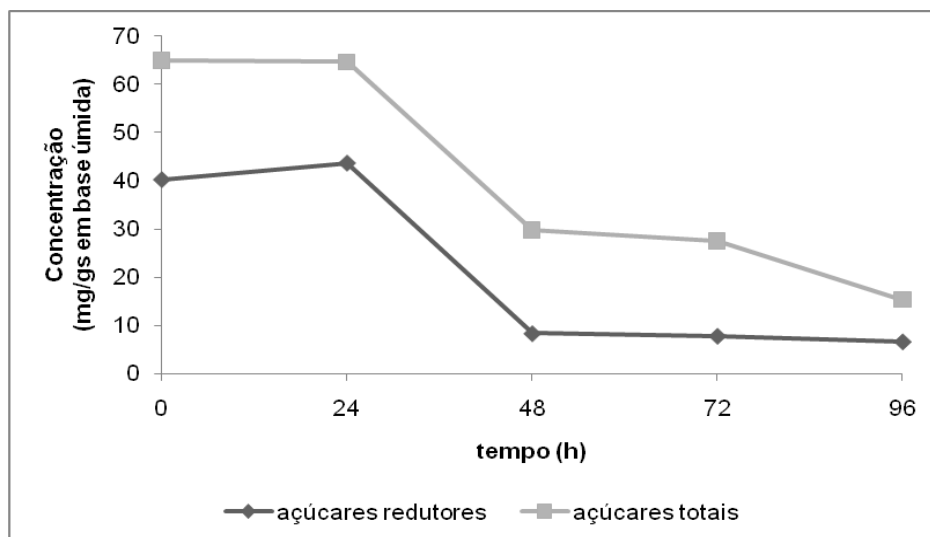


Figura 21: Consumo de açúcares durante FES para análise de pectinase

5.9.4 Atividade de Esterase

Utilizando amostras congeladas a atividade máxima obtida foi de 92,90 U/gs para esterases que hidrolisam o álcool etílico em 72 horas de fermentação e 7,33 U/gs para álcool isoamílico sintetizando o acetato de etila e de isoamila respectivamente (Figura 22). Para amostras congeladas e depois secas em estufa a 45°C por 24 horas os resultados máximos foram de 16,93 e 5,03 U/gs isto em tempo de 24 horas de fermentação (Figura 23).

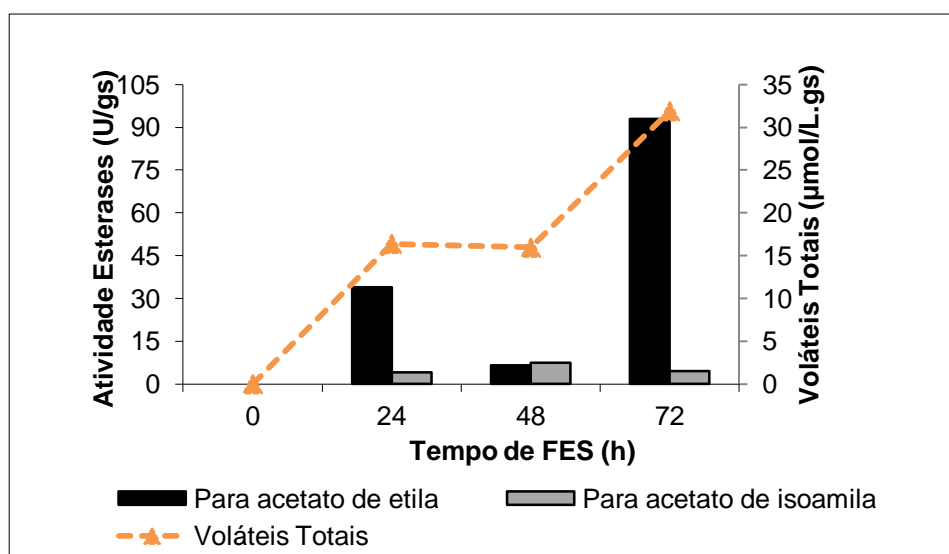


Figura 22: Resultados de atividade de esterases em fermentado congelado durante FES

Observou-se que as amostras congeladas tiveram resultados de atividade de esterase correspondentes a produção de voláteis totais que foi máxima em tempo de 72 horas de 31,9 µmol/L.gs, mas as amostras secas tiveram uma atividade de esterase diminuída, provavelmente devido à ação do calor durante a secagem e sua evolução não acompanhou a produção de voláteis totais (Figura 23). A partir destes resultados, pode-se considerar que as esterases que sintetizam o álcool isoamílico em acetato de isoamila podem ser provavelmente correspondentes a atividade do álcool acetil transferase que devem ser confirmadas com a presença de acetil-CoA no meio reacional como substrato, o que não foi realizada neste trabalho devido ao alto custo deste produto.

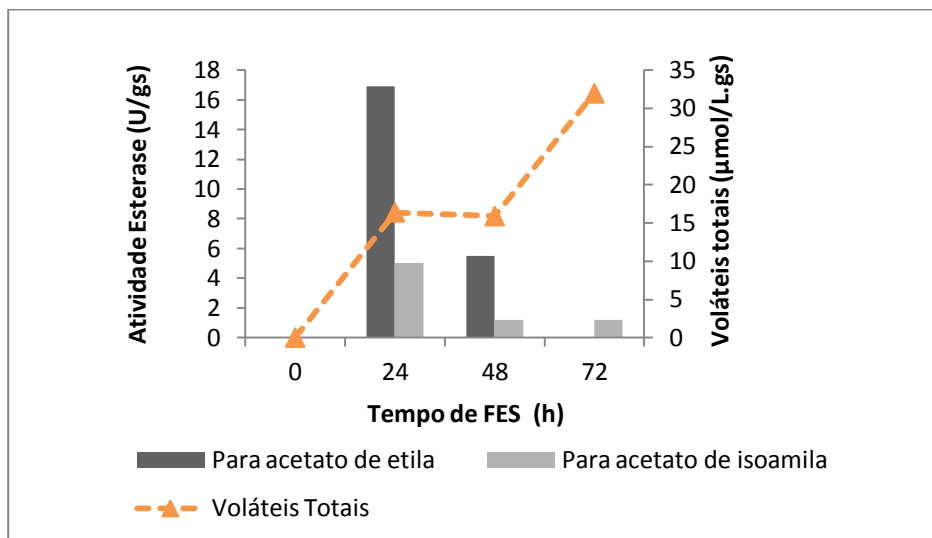


Figura 23: Resultados de atividade de esterases em fermentado congelado e seco em estufa durante FES

Considerando as condições físicas e químicas (Figura 24) os melhores resultados de atividade de esterase de *C. fimbriata* foram: pH de aproximadamente 6,0 nos tempos de 24 e 72 horas de fermentação (pH=5,94 e 5,83 respectivamente).

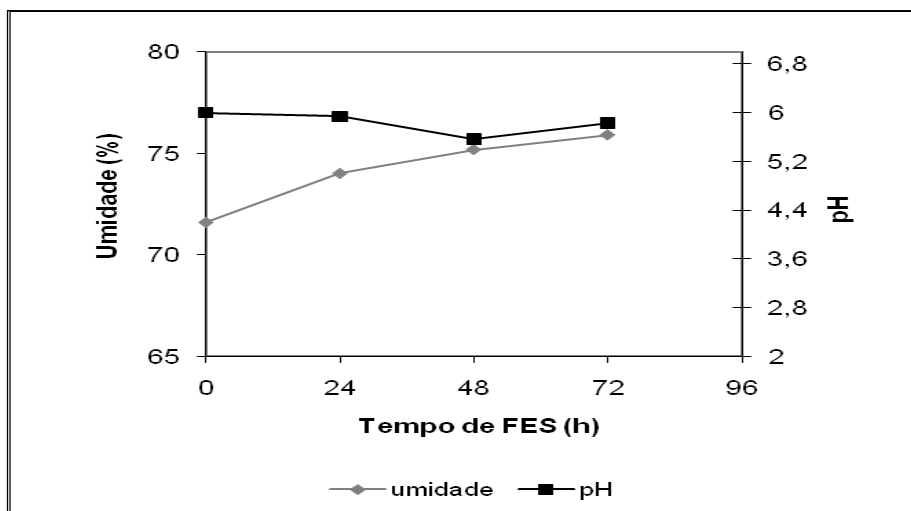


Figura 24: Condições Físico-Químicas durante FES para análise de esterases

Segundo Fahmy *et al.*, (2008) a atividade ótima para esterases cai gradualmente quando a temperatura é aumentada a partir de 40°C e o pH ótimo para esterases de *Curcubita pepo* é entre 8.0-9.0. O pH e temperaturas ótimas dependem de cada microorganismo que a enzima provem, por exemplo, pH 8.0 e temperatura de (65-75°C) para *A.fatua* (Mohamed *et al.* 2000). Explicando assim uma queda na atividade em tempo de 48 horas de FES nas amostras congeladas devido à variação de pH de 5,94 para 5,57 e nas amostras que foram secas a 45°C devido a estabilidade da enzima em função do calor aplicado no processo de secagem. Estudos de temperatura ótima não foram realizados neste trabalho, já que o objetivo principal era simplesmente caracterizar as enzimas envolvidas no processo de produção de aromas.

5.9.5 Atividade de Lipase

Para verificar se esta cepa era produtora de lipase, realizou-se FES em placas de Petri com meio ágar contendo o corante Rodamina B e zeite de oliva. Verificou-se que esta cepa não era produtora de lipase (dados não apresentados), pois conforme Fernandes *et al.* (2006), quando estas são produtoras ocorre a formação de halos alaranjados, fosforescentes ao UV nestas condições. Mesmo assim, optou-se por continuar o estudo da lipase, pois esta cepa quando inoculada em substrato contendo PC, FS e MC, descrito acima, produz uma grande variedade de ésteres, os quais são produtos das reações enzimáticas de lipases e esterases (PASTORE e UENOJO, 2006).

Determinou-se a atividade lipolítica pelo método titulométrico para confirmar a presença de lipases ditas “verdadeiras” (LIMA *et al.* 2004) no extrato bruto e os seguintes resultados foram encontrados: atividade lipolítica máxima de 40,98 U/gs e concentração de voláteis totais de 57,37 µmol/L.gs em tempo de FES de 48 horas, apresentados na Figura 25, a atividade de lipase acompanhou o mesmo perfil da produção de voláteis totais relacionando claramente a sua influência na produção dos mesmos. Como o objetivo desta análise era

simplesmente detectar a presença de lipase, o método do p-nitrofenol laurato ou palmitato não foi realizado já que estes reagentes sintéticos não caracterizam as lipases verdadeiras e sim todas as lipases (verdadeiras e esterases). Rigo *et al.* (2010), apresentaram atividade máxima de 139,2 e 140,7 U/gs (determinadas pelo método titulométrico) de lipases de *Penicillium* P58 e P74 respectivamente após 48 horas de FES utilizando como substrato farelo de soja com suplementação de uréia e óleo de soja. Fernandes *et al.* (2006), obteve uma atividade lipolítica máxima de 108 U/gs com o método de p-nitrofenol palmitato (p-NPP), substrato sintético, e confirmou este resultado da lipase de *Bulkholderia cepadia* com o método titulométrico obtendo 42 U/gs utilizando substrato de trioleína em tempo de FES de 70 horas com farelo de milho enriquecido com 5% (p/v) de óleo. Messias *et al.* (2009) obteve uma atividade máxima de lipase de 32,7 U/mL (p-nitrofenol palmitato) e 4,2 U/mL pelo método titulométrico utilizando trioleína (C18:1), este autor também utiliza o método titulométrico somente para confirmar que a lipase de *Botryosphaeria ribis* é verdadeira visto que as esterases não hidrolisam trioleína, estas preferem substratos de cadeias curtas. Lima *et al.* (2004), em estudos com extratos crus de *Bacillus megaterium* com diferentes substratos em solução aquosa obteve atividades máximas de 58 U/mg e 10 U/mg de substrato para p-NPP e trioleína respectivamente. Sun e Xu (2008) obtiveram atividade máxima com substrato sintético de 24,47 U/g durante 72 horas de FES com *Rhizopus chinensis* utilizando como substrato uma mistura de arroz, farinha de milho, farinha de trigo, cevada, aveia, farelo de trigo, farelo de arroz, casca de trigo e soja em pó com adição de 2% de óleo de oliva e 2% de peptona.

Sendo assim, os resultados obtidos com *C. fimbriata* neste trabalho podem ser considerados relevantes, pois neste não foi preciso à adição de óleo para induzir a produção da lipase. Esta cepa microbiana utilizou somente o óleo presente no farelo de soja (2% conforme IMCOPA, 2011) mais rápida que Fernandes *et al.* (2006). Nos estudos de lipase, encontraram-se resultados significativos em relação a autores que trabalharam em FES o qual o principal objetivo era produzir lipase com meio adicionado de precursores para esta enzima, sendo o máximo de 42 U/gs e produtividade de 0,6 U/g.h. Neste trabalho

a atividade lipolítica máxima foi de 40,98 U/gs com produtividade de 0,85 U/g.h. Comparando o perfil da atividade lipolítica com a produção de voláteis totais, ambos se comportaram praticamente da mesma forma (Figura 29).

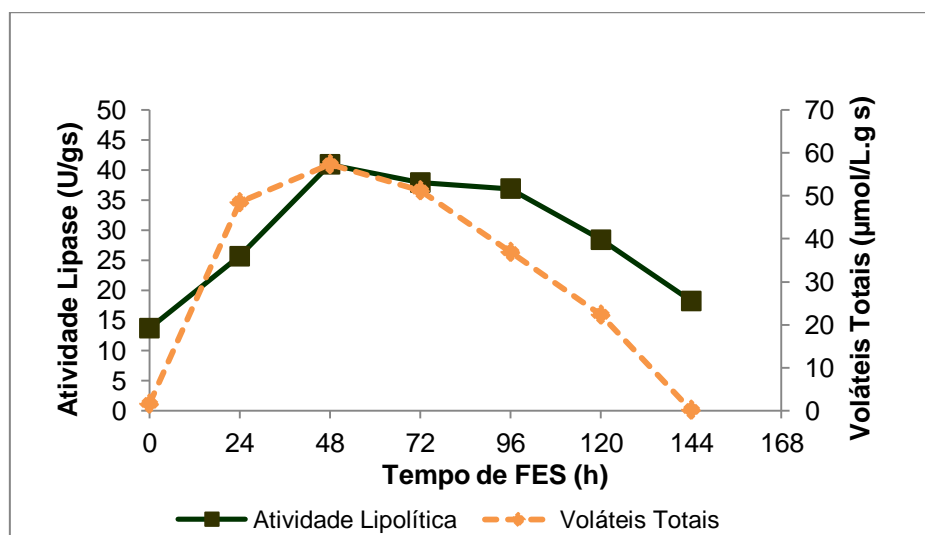


Figura 25: Atividade da lipase e produção de voláteis totais em FES pela cepa *C. fimbriata* CBS 374.83.

A concentração de proteínas foi praticamente constante até 72 horas de FES, em seguida uma queda, o que acompanha a atividade enzimática que começa a diminuir e em seguida aumenta novamente. Estes valores são confirmados pelos resultados apresentados nas Figuras 17 e 26, no qual a biomassa apresenta uma leve queda entre 72 e 96 horas e depois um aumento linear até o tempo de 144 horas, seguindo o mesmo perfil atividade lipolítica e da concentração da biomassa, esta última aumentou muito, aproximadamente 0,6 g/gs até 144 horas de FES.

Não foram realizados estudos para além deste tempo porque a produção de voláteis totais diminui bruscamente em 96 horas, bem como a atividade enzimática.

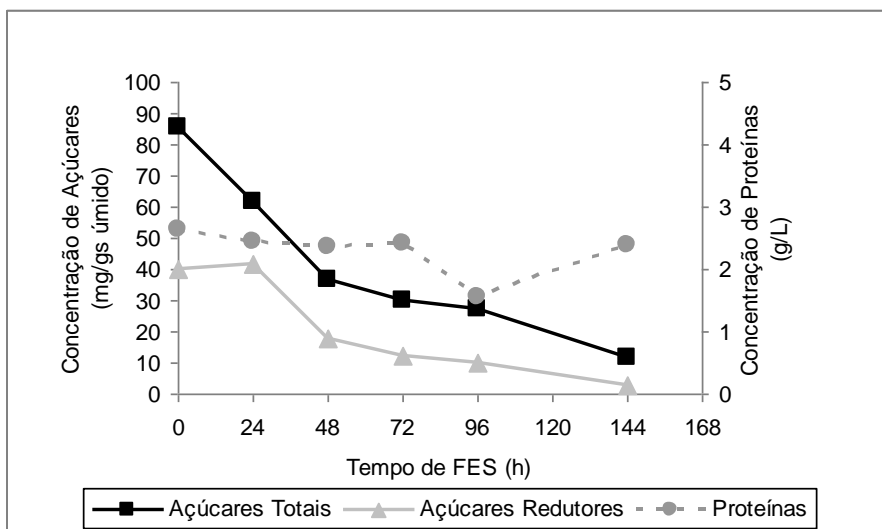


Figura 26: Consumo de açúcares totais e redutores durante a FES, e concentração de proteínas.

Nestes experimentos, a máxima atividade foi observada com umidade de 75,43% e pH de 5,57(Figura 27). Segundo Lima *et al.* (2004) a atividade ótima para lipases de fungos e leveduras é entre pH de ácido a neutro (4,0 -7,0), com resultados para extrato de *Bacillus megaterium* atividade relativa entre 75 – 100% respectivamente pelo método *p*-NPP. Uma atividade entre 70-95% para pH entre 5,0-7,0, respectivamente, para lipases de *Aspergillus niger*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium solitum* foi obtida por Carvalho *et al.* (2005). Enquanto Pastore *et al.* (2003) encontraram resultados de atividade relativa entre pH 5,0-7,0 de 55-95% para lipases de *Rhizopus sp.*

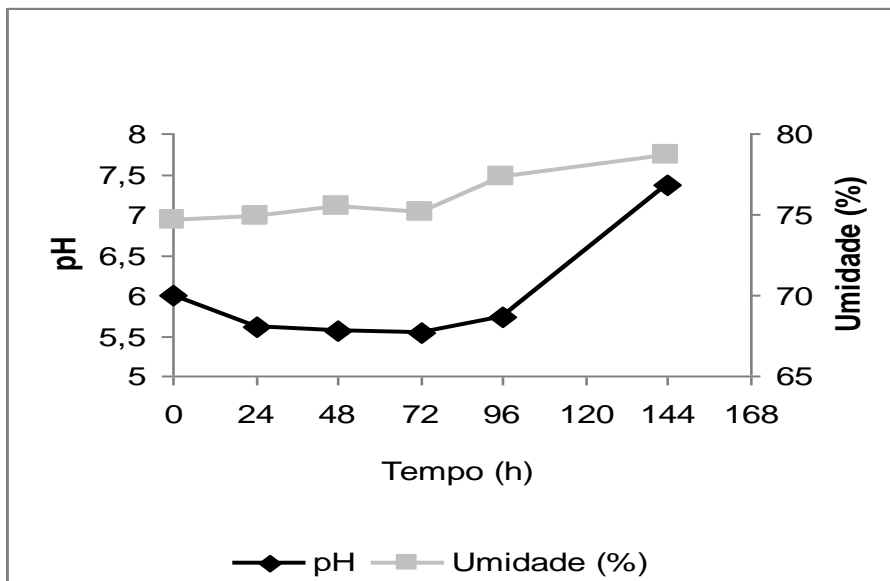


Figura 27: Condições Físico-Químicas durante FES para análises de lipases

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram estudadas as condições para produção de aroma testando duas espécies de *C. fimbriata* por FES, primeiramente utilizando polpa cítrica como substrato e em seguida realizando o estudo do perfil enzimático deste processo.

A melhor cepa de *C. fimbriata* foi a 374.83, o qual produziu maior concentração de voláteis totais em menor tempo de FES (48 horas). Oito componentes de aroma foram identificados: acetaldeído, acetato de etila, acetato de isoamila, acetato de propila, etanol, 2-hexanol, 2-hexanona e isobutirato de etila.

Na otimização de variáveis físicas e químicas foram determinadas as seguintes condições mais apropriadas para a produção de aromas: pH inicial 6,0, taxa de inóculo de 10^7 esporos/g de massa seca, umidade inicial 75%, temperatura de incubação 30 °C e granulometria da polpa cítrica entre 0,8-2,0mm.

Visando aumentar a produção de voláteis totais, a adição de melaço de cana, farelo de soja e solução salina foram testadas. O substrato composto de uma mistura de 10 g polpa cítrica com 12 g farelo de soja e 15 % de melaço de cana aumentaram significativamente a produção de voláteis totais de 70 para aproximadamente 100 $\mu\text{mol/L.gs}$.

Após otimização, foram investigadas a presença de 3 enzimas: pectinase, esterases e lipase neste processo de produção de aromas por FES. Devido à grande concentração de pectina existente no substrato, (polpa cítrica apresenta alto teor de pectina), a atividade de poligalacturase extracelular foi pesquisada. A máxima atividade encontrada foi de 59,59 U/gs, sendo que esta enzima pode estar indiretamente envolvida com a produção de componentes de aroma. Nos experimentos de FES realizados para este estudo, a produção de voláteis totais foi de apenas 45 $\mu\text{mol/L.gs}$. Isto indica que os nutrientes mais facilmente assimiláveis pelo microorganismo vão sendo consumidos e a prioridade de produção é de enzimas que participam de reações de esterificação como as esterases e lipases.

A atividade de esterases foi de 92,9 U/gs (álcool etílico) e 7,33 U/gs (álcool isoamílico) em 72 horas de fermentação. A produção de voláteis totais nesta FES foi maior em 72 horas e a atividade seguiu o mesmo perfil da produção de voláteis totais.

Nos estudos de lipase, encontraram-se resultados significativos. A atividade lipolítica máxima foi de 40,98 U/gs com produtividade de 0,85 U/g.h. Comparando o perfil da atividade lipolítica com a produção de voláteis totais, pode-se dizer que a atividade desta enzima está diretamente relacionada com a produção dos voláteis.

Neste trabalho, os resultados obtidos indicaram que os subprodutos: polpa cítrica, farelo de soja e melaço de cana favorecem a produção de compostos de aroma. Além disso, as enzimas analisadas presentes no meio fermentativo estão envolvidas direta ou indiretamente neste processo de produção de aromas pelo fungo *C. fimbriata* utilizando a FES.

7. TRABALHOS FUTUROS/PERSPECTIVAS

Estudos de outras enzimas envolvidas no processo de produção de aromas como lipooxigenase e álcool acetil transferase.

Estudos desta lipase produzida por *C. fimbriata*, purificação, aplicação desta em substrato específico comercial. Utilização da lipase como produtora de ésteres.

Recuperação dos compostos de aroma produzidos por FES. Recuperação destes em frascos de análises respirométricas conforme norma NBR.

Estudos de pH ótimo para produção de aromas com a cepa *Ceratocystis fimbriata*.

REFERÊNCIAS

ABECITRUS – Disponível em: <[HTTP://www.abecitrus.com.br/subprobr.html](http://www.abecitrus.com.br/subprobr.html)>. Acessado em: 30 mar. 2009.

AGUEDO M.; LYM. H. The use of enzymes and microorganisms for the production of aroma compounds from lipids. **Food Technol. Biotechnol.** Portugal, 2004.

ALEXANDRINO, A. M.; FARIA, H. G.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M.; Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, n. 27, v. 2, p. 364-368, 2007.

ALVAREZ-MACARIE, E.; BARATTI, J.; Short chain flavour Ester synthesis by a new esterase from *Bacillus licheniformis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, p. 377-383, 2000.

ANVISA - **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Regulamento técnico sobre Aditivos Aromatizantes/ Aromas da Resolução nº 104 de 14 de maio de 1999.

AYUB, M. A. Z.; HERTZ, P.F. Conversão de resíduos agroindustriais da soja em etanol e outros solventes orgânicos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de ciência e Tecnologia de Alimentos – laboratório de biotecnologia. 2002.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Planejamento e Otimização de Experimentos. 2. ed, v.1, Campinas,SP:Editora da Unicamp, 300 p., 2001.

BLANDINO, A.; DRAVILLAS, A. K. Utilisation of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. **Process Biochemistry**, n. 37, p. 497-503, 2001.

BRADY L.; BRZOWSKI A.M.; DEREWENDA Z.S.; DODSON E.; DODSON E.; TOLLEY S.; TURKEYNBURG J.P.; CHRISTIANSEN L., HUGE-JENSEN B., NORSKOV L.; MENGE U. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v.343, p. 767-770,1990.

BRADY, D.; JORDAAN, J.; SIMPSON, C.; CHETTY, A. ARUMUGAM C,MOOLMAN F.S. Spherezymes: a novel structured self - immobilisation enzyme technology. **BMC Biotechnol**, 2008.

BRINGHENTI, L.; CABELLO, C.; URBANO, L. H. Fermentação Alcoólica de Substrato Amiláceo Hidrolisado Enriquecido com Melaço de Cana. **Ciência e Agrotecnologia**, n. 2, v. 31, p.429-432, 2007.

BLUEMKE, W.; SCHRADER, J. Integrated bioprocess for enhanced roduction of natural flavors and fragrances by *Ceratocystis moniliformis*. Elsevier. **Biomolecular Engineering**. n. 17, p. 137-142, 2001.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, n. 72, p. 248-254, 1976.

BRAMORSKI, A., CHRISTEN, P.; RAMIREZ, M.; SOCCOL, C. R.; REVAH S. Production of volatile compounds by the edible fungus *Rhizopus oryzae* during solid state cultivation on tropical agro-industrial substrates. **Biotechnol Lett** 20, p.359 - 362, 1998.

BROCKMAN H.L. Triglyceride lipase from porcine pancreas. Methods. **Enzymol** 71, p.619-627, 1984.

BUTTERY R., SHAHIDI F., TERANISHI R. Natural Flavours by Biotechnological Processing. In: Flavour Chemistry: Trends and Developments, **ACS Symposium Series**, 388, 2° Ed. Washington, USA, 1989.

CAMARGO, L.A.; DENTILLO D.B.; CARDELLO L.; GATTÁS E.A.L. Utilização de Bagaço de Laranja na Produção de Pectinases de *Aspergillus sp*, **ALIMEN NUTR**, v.16,n.2,p.153-156,junho,2005.

CANAN, T.; DOGAN, N. Biochemical and thermal characterization of crude exopolysaccharidase produced by *Aspergillus sojae*. **Food Chemistry** 111 824–829, 2008.

CARVALHO, P.O.; CALAFATTI S.A.; MARASSI M.; SILVA D.M.; CONTESINI F.J.; BIZACO R. Potencial de Biocatálise Enantiosseletiva de Lipases Microbianas. **Química Nova**, Vol.28, No.4, p-614-621, 2005.

CASTILHO, L. R.; MEDRONHOB, R. A. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology** 71, p. 45-50, 2000.

CHAHINIAN, H.; ALI Y. B.; ABOUSALHAM A.; PETRY S.; MANDRICH L.; MANCO G.; CANAAN S.; SARDA L. Substrate specificity and kinetic properties of enzymes belonging to the hormone-sensitive lipase family: Comparison with non-lipolytic and lipolytic carboxylesterases. **Biochimica et Biophysica Acta** 1738 ,p.29 -36, 2005.

CHIAPPINI C.C.J. Aromas naturais produzidos por microorganismos. Revista Eletrônica de Jornalismo Científico. Disponível em: <http://www.comciencia.br/comciencia/?section=8&edicao=28&id=325>
Acesso em 25/02/2011.

CHRISTEN, P. Producción de aromas por fermentación en medio solido. Tópicos de Investigación y Posgrado IV, No. 2, p. 102-109, 1995.

CHRISTEN, P.; RAIMBAULT, M. Optimization of culture medium for aroma production by *Ceratocystis fimbriata*. **Biotechnology Letters**, Vol. 13, p. 521-526, 1991.

CHRISTEN P.; MEZA J.C.; REVAH S. Fruity aroma production in solid state fermentation by *Ceratocystis fimbriata*: influence of the substrate type and the presence of precursors. **Mycol.Res.** ed.101,n.8,p.911-919, 1997.

CHRISTEN, P.; BRAMORSKI, A.; REVAH, S.; SOCCOL C.R. Characterization of volatile compounds produced by *Rhizopus* strains grown on agro-industrial solid wastes. **Biores Technol** 71, p.211-215, 2000.

COUTO, R. S.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry —A review. **Journal of Food Engineering**, Elsevier. 2006.

COUTO R.S.; SANROMÁN M.A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**, n.22,p.211-219, 2005.

DHEEMAN D.S.; HENEHAN G.T.M.; FRÍAS J.M. Purification and properties of *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 lipase and its potencial in flavour ester synthesis. **Bioresource Technology** 102, p.3373-3379, 2011.

EGLOF M.P.; RANSAC S.; MARGUET F.; ROGALSKA E.; VAN TILBEURGH H.; BUONO G.; CAMBILLAU C.; VERGER R. Les lipases: cinétiques, spécificités et aspects structuraux. In Malcata, F.X. (Ed). Engineering of/with lipases. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers,1995.

FAHMY A.S.; ZEID A.Z.; MOOHAMED T.M.; GHANEM H.G.; BORAI I.H.; MOHAMED S.A. Characterization of Esterases from *Cucurbita pepo* cv.“Eskandrani”. **Bioresource Technology** 99, p.437-443, 2008.

FENNEMA, O. R. Química de los alimentos. Editorial Acirbia, Zaragoza, 1993.

FERON G.; BONNARME P.; DURAND A. Prospects for the microbial production of food flavours. **Elsevier Science Ltda**, 1996.

FERNANDES, M.L. M; SAAD E.B.; MEIRA J.A.; RAMOS L.P.; MITCHELL D.A.; KRIEGER N. Esterification and transesterification reactions by addition of fermented solids to organic reaction media, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 263, p.8-13, 2006.

FERNANDES M.L.; SAAD E.B.; MEIRA J.A.; RAMOS L.P.; MITCHELL D.A.; KRIEGER N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reactions media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 44, p.8-13, 2007.

FERRATO, F.; CARRIERE F.; SARDA L.; VERGER, R. A critical re-evaluation of the phenomenon of "interfacial activation". **Methods Enzymol**, p. 327-47, 1997.

GRAMINHA E.B.N.; GONÇALVES A.Z.L.; PIROTA R.D.P.B.; BALSALOBRE M.A.A.; SILVA R.; GOMES E.; Enzyme production by solid-state. Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, n.144, p.1-22, 2008.

HASAN F.; AAMER A.; SHAH A.A.; HAMEED A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 39, p. 235-251, 2006.

HINRICHSSEN L.L.; MONTEL M.C.; TALON R. Proteolytic and lipolytic activities of *Mirococcus roseus*, *Halomonas elongata* and *Vibrio* sp isolated from Danish bacon curing brines. **Journal of Food Microbiology** 22, p.115-126, 1994.

HIRATA G.A.M.; BERNARDO A.; MIRANDA E.A. Crystalization of Porcine Insulin with Carbon Dioxide as Acidifying Agent. **Powder Technology** 197, p.54-57, 2010.

HOLKER U.; LENZ J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.24, p.175-186, 2004.

IMCOPA - Boletim técnico – Farelo de Soja. Disponível em: <<http://www.imcopa.com.br/?p=produtos/farelo>> Acesso em: 14 jan. 2011.

JACKOWETZ J.N.; DIERSCHKE, S.; MIRA DE ORDUÑA, R. Multifactorial analysis of acetaldehyde kinetics during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Research International**, v. 44, p.310–316, 2011.

JAEGER, K.E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B.W.; COLSON, C.; VANHEUVEL, M.; MISSET O. Bacterial lipase. **FEMS Microbiology**. n.15, p.29-63, 1994.

JAEGER K.E.; REETZ M.T. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. **Trends Biotechnology**, v.16, p.396-403, 1998.

JAEGER K.E.; EGGERT T. Lipases for biotechnology. **Biotechnology**, v.16, p. 390-397, 2002.

JAEGER, K.E.; STEINBUCHER A.; JENDROSSEK D. Substrate specificities of bacterial polyhydroxyalkanoate depolymerases and lipases: bacterial lipases hydrolyze poly (omega-hydroxyalkanoates). **Appl Environ Microbiol** n.61, p.3113–3128, 1996.

JANSSENS, L.; DePOOTER, H.L.; SCHAMP, N. M.; VANDAMME, E. J. Production of flavours by microorganisms. **Process in Biochemistry**, v. 27, 195-215, 1992.

JAYANI, R. S.; JAEGER, K.E. EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Curr Opin Biotechnol**, n. 13, p. 390–397, 2002.

JAYANI R. S., SAXENA S., GUPTA R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry** 40, p.2931–2944, 2005.

KEMPLER, G. M. Production of flavor compounds by microorganisms. **Advances in Applied Microbiology**, v. 29, 29-51, 1983.

KILCAWLEY K.N.; WILKINSON, M.G.; FOX, P.F. Enzyme-Modified Cheese. **Int. Dairy Journal** 8, p.1-10,1998.

LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N., MITCHELL, D.A., RAMOS,L.P., FONTANA,J.D., Kinetic characterization of the potencial for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2004.

LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N., MITCHELL, D.A., BARATTI J.C.; FILIPPIS I.; FONTANA J.D. Evaluation of the potencial for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 31, p. 53-61, 2004.

LONGO, M. A.; SANROMÁN, M. A. Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies. **Food Technol. Biotechnol** v.44, n° 3, p.335-353,2006.

LOSADA, M. M.; ANDRÉS, J.; CACHO, J.; REVILLA, E.; LÓPEZ, J. F. Influence of some prefermentative treatments on aroma composition and sensory evaluation of white Godello wines. **Food Chemistry** 125, p. 884–891,2011.

LU, Z. M.; TAO, W.Y.; XU, H.Y.; LIMB, J.; ZHANG; X. M.; WANG; L. P.; CHEN; J. H.; XU, Z. H. Analysis of volatile compounds of *Antrodia camphorata* in submerged culture using headspace solid-phase microextraction. **Food Chemistry**. n. 127, p. 662–668, 2011.

LUERCE, R. F. Produção de acetoina por *Bacillus polymyxa*. Tese (pós-graduação em engenharia química)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

MACEDO, G.A.; LOZANO, M. M. S. ; PASTORE, G.M. Enzymatic synthesis of short chain citronellyl esters by a new lipase from *Rhizopus* sp. **Journal of Biotechnology** 1, v.6, 2003.

MAHAPATRA, P.; KUMARI, A.; GARLAPATI, V.K.; BANERJEE, R.; NAG, A. Enzymatic synthesis of fruit flavor esters by immobilized lipase from *Rhizopus oligosporus* optimized with response surface methodology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 60, p. 57-63, 2009.

MALAMAN, F.S.; MORAES, L.A.; WEST, C.; FERREIRA, N.J.; OLIVEIRA, A.L.; Supercritical fluid extracts from the Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.): Relationship between the extracted compounds and the characteristic flavour intensity of the fruit. **Food Chemistry**, n.124, p.85-92, 2011.

MARQUES, S.; PALAB, H.; ALVES, L., AMARAL-COLLAC, O.A.; Characterization and Application of Glycanases Secreted by *Aspergillus terreus* CCMI 498 and *Trichoderma viride* 84 for Enzymatic Deinking of Mixed Office Wasterpaper. **Journal of Biotechnology** 100, p.209-219, 2003.

MCKAY, A.M. Microbial carboxylic ester hydrolases (EC 3.1.1) in food biotechnology. **Appl. Microbiology**, n.16, p.1-6, 1993.

MEDEIROS, A.B.P.; PANDEY A.; FREITAS R.J.S.; SOCCOL C.R. Optimization of the production of aroma compounds by *Kluveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal** 6, p.33-39, 2000.

MEDEIROS, A.B.P.; PANDEY, A.; VANDENBERGUE, L. P. S.; PASTORE, G.M. ; SOCCOL, C.R. Production and Recovery of Aroma Compounds Produced by Solid-State Fermentation Using Different Adsorbents, **Food Technol. Biotechnol** v.1, n.44,p.47-51,2006.

MEDEIROS, A.B.P.; PANDEY, A.; VANDENBERGUE, L. P. S.; PASTORE, G.M. ; SOCCOL, C.R. Coffee Residues as Substrates for Aroma Production by *Ceratocystis Fimbriata* in Solid State Fermentation, **Brasilian Journal of Microbiology**, n.34, p.245-248, 2003.

MEDEIROS, A.B.P.; ROSSI, S.C.; SOCCOL C.R. **Cell culture for flavor production**. HANDBOOK of Fruity and Vegetable Flavors, cap. 6, p.95-100, 2010.

MESSIAS, J.M.; COSTA, B.Z.; LIMA, V.M.G.; DEKKER, R.F.H.; MREZENDE, M.I.; KRIEGER, N.; BARBOSA, A.M. Screening *Botryosphaeria* species for lipases: Production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology** 45, p. 426-431, 2009.

MOHAN, R.; SOCCOL, C.R.; QUOIRIN, M.G.; PANDEY A. Use of sugarcane bagasse as an alternative low cost support material during the rooting stage of apple micropropagation. In vitro Cell. **Dev.Biol.-Plant, Oxon**, v.40,n.4,p.408-411, 2004.

MOHAMED, M.A.; MOHAMED; T. M., MOHAMED; S. A., FAHMY, A. S. Distribution of lipases in the Gramineae. Partial purification and characterization of esterases from *Avena fatua*. **Bioresource technology** 73, p.227-234, 2000.

MURADO M. A. GONZÁLEZ M. P., TORRADO A., PASTRANA L. M. Amylase production by solid state culture of *Aspergillus oryzae* on polyurethane foams. Some mechanistic approaches from an empirical model. **Process Biochemistry**, V. 32, No. 1, p. 35-42, 1997.

NETO R.S.; PASTORE, G.M. ; MACEDO, G. A. Biocatalysis and Biotransformation Producing γ -decalactone. **Food Chemistry and Toxicology** 9, v. 69, 2004.

NOGUEROL-PATO R.; GONZÁLEZ-BARREIRO, CANCHO-GRANDE B.; SIMAL-GÁNDARA, J. Quantitativa determination and characterisation of the main odourants of Mencía monovarietal red wines. **Food Chemistry**, n.117, p.473-484, 2009.

OTERHOLM A.; WITTER L.D.; ORDAL, J.Z. Purification of properties of an acetyl ester hydrolase (acetylcetase) from *Lactobacillus plantarum*. **Journal Dairy Science**, n.55, p.8, 1972.

OZAKI, E.; URAGAKI, T., SAKASHITA, K.; SAKIMAE, A. Enzymatic preparation of alkanedicarboxylic acid monoesters. **Chemistry Letters**, n°.7, p. 539-540, 1995.

OXITENO. Boletim Técnico – Acetato de Isopentila. Disponível em:
<<http://www.oxiteno.com.br/aplicacoes/mercados/doc/documento.asp?produtoMarca=151041173715041514040362331D43L9944GFBEE34DC&idioma=PO&r=.pdf>>
> Acessado em: 29 jan. 2008.

PANDA, T.; GOWRISHANKAR B.S. Critical analysis of application of generalized distance function for optimization of important variables for esterase synthesis by *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology** 99, p.5545-5555, 2008.

PANDEY, A.; SOCOOL, C. R. **Biotechnological potential of agro-industrial residues**. II: cassava bagasse. Bioresource technology. Elsevier. Brasil, 2000.

PANDEY A., LARROCHE, C. SOCCOL C.R. DUSSAP C.G. Production of aroma compounds. In: **Current developments in Solid-state Fermentation**. India: Springer. Asiatech publishers, Inc, 2008.

PASTORE, G.M.; UENOJO, M. Isolamento e Seleção de Microorganismos Pectinolíticos a Partir de Resíduos Provenientes de Agroindústrias para Produção de Aromas Frutais, **Ciência e Tecnol. Aliment.**, v.26,n.3,p.509-515, 2006.

PASTORE, G.M.; COSTA, V.S.R.; KOBLITZ, M.G.B. Purificação Parcial e Caracterização Bioquímica de Lipase Extracelular Produzida por Nova Linhagem de *Rhizopus* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n.23, v.2, p.135-140, 2003.

PASTRANA, L. M., GONZALEZ, M. P., PINTADO, J., MURADO, M.A. Interactions affecting gibberellic acid production in solid-state culture: A factorial study. **Enzyme and Microbial Technology** 17, p.784-790, 1995.

PATURAU, J.M. Alternative uses of sugarcane and it's by products in agroindustries. Disponível em: www.fao.org/docrep/003/s8850e/S8850E03.htm Acessado em: 06 abr.2011.

PEREIRA, C.D.A. Produção de Metabólitos Voláteis Frutais por *Kluyvaromyces marxianus* em fermentação submersa em meio a base de melaço de soja. Dissertação de Mestrado em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2007.

PLATA, M.C.; MAURICIO, J.C.; MILLÁN, C.; ORTEGA, J.M. In Vitro Activity of Alcohol Acetyltransferase and Esterase in Two Flor Yeast Strains during Biological Aging of Sherry Wines. **Journal of Fermentation and Bioengineering** 85, p.369-374, 1998.

PINTO, G. M. F. **Química orgânica prática**. Análise de compostos orgânicos. Creative Commons em <http://creativecommons.org.br>, São Paulo. 2006.

QUILTER, M.G.; HURLEY, J.C.; LYNCH, F.J.; MURPHY, M.G. The production of isoamyl acetate from amyl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the Institute of Brewing**, v.109, p. 34-40, 2003.

RAIMBAULT, M. General and microbial aspects of solid state fermentation. In-International training Course on Solid State Fermentation, FMS 97, 6-10 Octobre, Curitiba, Brasil, Documento ORSTOM, Montpellier, França, 1997.

RICHARD, P.; HILDITCH, S. D-Galacturonic acid catabolism in microorganisms and its biotechnological relevance. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 82, p. 597–604, 2009.

RIGO, E.; NINOW, J.L.; LUCCIO, M.D.; OLIVEIRA, J.V.; POLLONI, A.E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. **Food Science and Technology** 43, p. 1132-1137, 2010.

ROCHA, G. J. M.; MARTIN, C.; SOARES, I. B.; MAIOR, A.M.S.; BAUDEL, H.M.; ABREU, C.A.M.; Dilute Mixed-Acid Pretreatment of Sugarcane Bagasse for Ethanol Production. **Biomass and Bioenergy** 35, p.663-670, 2011.

RODRIGUES, C. Produção e Purificação de Hormônio Vegetal (Ácido Giberélico) por Fermentação no Estado Sólido em Polpa Cítrica e Utilização do Extrato Fermentado em Meio de Cultivo de Bromélias *in vitro*. Tese de doutorado em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2010.

RODRIGUES C.; VANDENBERGHE, L.P.S.; OSS, J.F.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. A new alternative to produce giberellic acid by solid state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology** v.52, p.181-189, 2009.

RODRIGUEZ, J.A.; MATEOS, J. C.; NUNGARY, J.; GONZÁLEZ, V.; BHAGNAGAR, T.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; BARATTI J. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochem.**, nº21, p. 2264-2269, 2006.

ROJAS, V.; GIL, J. V.; MANZANARES,, P.; GAVARA R.; PIÑAGA, F.; FLORS, A. Measurement of alcohol acetyltransferase and ester hydrolase activities in yeast extracts. **Enzyme and Microbial Technology** 30, p.224-230, 2002.

ROMERO, M. D.; CALVO, L. *et al.* Enzymatic synthesis of isoamyl-acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in n-hexane. **Enzyme and microbial technology**. Elsevier 2004.

ROSSI, S. C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; PEREIRA, B. M. P.; GAGO, F. D.; RIZZOLO, J.A., PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. ; MEDEIROS, A.B.P. Improving fruity aroma production by fungi in SSF using citric pulp. **Food Research International**, v. 42, p.484-486, 2009.

SAAD, E. B. Etanolise do óleo de milho empregando catalisadores alcalinos e enzimáticos. Tese (Mestrado em Química)- Universidade Federal do Paraná, 2005.

SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas como agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto, SP: Legis Summa, 2005.

SAISON, D.; SCHUTTER, D. P.; UYTENHOVE, B.; DELVAUX, F.; DEUVAUX, F. R. Contribution of staling compounds to the aged flavor of lager beer by studying their flavor thresholds. **Food Chemistry**, n.114, p.1206-1215, 2009.

SALGADO, J.M., RODRÍGUEZ, N., CORTÉS, S., DOMÍNGUEZ, J.M., Development of cost-effective media to increase the economic potential for larger-scale bioproduction of natural food additives by *Lactobacillus rhamnosus*, *Debaryomyces hansenii*, and *Aspergillus niger*. **J. Agric. Food Chem.**; v.57 nº 21, p.10414–10428, 2009.

SARDA, L. E.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancréatique sur les ésteres emulsion. **Biochim.Biophys.Acta**. n.30, p.513-521,1958.

SARVAMANGALA, R. P.; DAYANAND, A. Optimization of process for the production of fungal pectinases from deseeded sunflower head in submerged and solid-state conditions. **Bioresource Technology** 97, p. 2340–2344, 2006.

SCHRAG, J. D.; CYCLER, M. Lipases and α/β hydrolases fold. **Methods Enzymology**, v.284, p.87-107, 1997.

SEITZ, L. M.; SAUER, D. B.; BURROUGHS, R.; MOHR, H. E.; HUBBARD, J. D. Ergosterol as a measure of fungal growth. **Phytopathology**, v. 69, p.1202-1203, 1979.

SIMÕES, D. R. S. Abordagem tecnológica e sensorial nos produtos de maçã: suco, fermentado e sidra. Tese de Doutorado em Tecnologia de Alimentos-Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2008.

SOARES, M., CHRISTEN, P., PANDEY, A., SOCCOL, C. R. Fruity flavour production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee husk in solid-state fermentation. **Process Biochemistry** 35, p.857-861, 2000.

SOARES M. Biossíntese de metabolitos voláteis frutais por *Pachyolen tannophilus* e *Ceratocystis fimbriata* pela fermentação no estado sólido da casca de café. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Química, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 1998.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 205-218, 2003.

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry** 195, p.19-23, 1952.

STUER, W.; JAEGER, K.E.; WINKLER, U.K. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v.168, p.1070-1074, 1986.

SUN, S.Y.; XU, Y. Solid-State fermentation for 'whole-cell synthetic lipase' production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. **Process Biochemistry** 43, p.219-224, 2008.

TISS, A.; CARRIÉRE, F; VERGER, R. Effects of Gum Arabic on Lipase Interfacial Binding and Activity. **Analytical Biochemistry** 294, p.36–43, 2001.

TOPAKAS, E.; KYRIAKOPOULOS, S.; BIELY, P. HIRSCH, J.; VAFIADI, C.; CHRISTAKOPOULOS, P. Carbohydrate esterases of family 2 are 6-0-deacetylases. **FEBS Letters**, n. 584, p.543-548, 2010.

TORRES S.; BAIGORÍ, M. D.; SWATHY, S. L.; PANDEY, A.; CASTRO, G. R. Enzymatic synthesis of banana flavour (isoamyl acetate) by *Bacillus licheniformis* S-86 esterase. **Food Research Internacional**. n. 42, p. 454-460, 2009.

TRESSL R.; JENNINGS W.G. Production of volatile compounds in the ripening banana. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 20, p. 189-92, 1972.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Isolamento e seleção de microrganismos pectinolíticos a partir de resíduos provenientes de agroindústrias para produção de aromas frutais. **Ciência e Tecnologia Aliment**. Brasil, 2006.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 30,n. 2, p. 388-394, 2007.

UNIÃO FARELOS. Disponível em: < www.uniãofarelos.com.br/>. Acessado em 28maio 2010.

UNICA – União da Indústria de Cana de açúcar. Disponível em <<http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/>>. Acessado em: 23 mar. 2011.

VERGER R., Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v.15, p. 32-38, 1997.

YOSHIOKA, K.; HASHIMOTO, N. Ester Formation by Alcohol Acetyltransferase from Brewer's Yeast. **Agric.Biology Chemistry**, No.45, v.10, p.2183-2190, 1981.

ZHENG, Z.; SHETTY, K. Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. **Process Biochem**. v. 35, n. 8, p. 825-830, 2000.